

COMMONWEALTH INST.
ENTOMOLOGY LIBRARY

16 SEP 1953

SERIAL *Eu. 375 B*

R EXD.

HÖFCHEN-BRIEFE

»Bayer« PFLANZENSCHUTZ-NACHRICHTEN

5
1952/3

VERÖFFENTLICHUNGEN DER »Bayer«-PFLANZENSCHUTZ-ABTEILUNG
LEVERKUSEN UND HÖFCHEN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Dr. Werner Pfaff:	
Untersuchungen über den Aufbau der Insektenkuli- kula und den Eindringungsmechanismus des Kontakt- insektizides E 605	93

Nachdruck gestattet



FARBENFABRIKEN BAYER

Verkauf Pflanzenschutz
LEVERKUSEN

Untersuchungen über den Aufbau der Insektenkutikula und den Eindringungsmechanismus des Kontaktinsektizides E 605

Von Dr. Werner P f a f f, Frankfurt/Main-Höchst

INHALTSÜBERSICHT

Literaturübersicht und Problemstellung	93
a) Grundlegende ältere Arbeiten	94
b) Bildung und Aufbau der Insektenkutikula	94
c) Chemische und physikalische Untersuchungen	96
d) Die Permeabilität der Kutikula	97
e) Problem- und Fragestellung	97
A. Die Struktur und Zusammensetzung der Kutikula von <i>Periplaneta americana</i> L.	98
1. Material und Methoden	98
2. Der Aufbau der Kutikula von <i>Periplaneta americana</i> L.	100
3. Die pH-Werte der einzelnen, die Kutikula aufbauenden Schichten	102
4. Anzahl und Inhalt der Porenkanäle	103
5. Die Proteinverteilung in der Kutikula	106
6. Extraktionsversuche	107
a) Verdauung der Proteine mit Pepsin	108
b) Extraktion der Lipoide	108
c) Gewichtsbestimmungen	109
7. Polarisationsoptische und elektronenmikroskopische Beobachtungen	110
8. Untersuchungen im ultravioletten Licht	111
a) an Querschnitten	111
b) an Flächenpräparaten	113
c) an der frisch gehäuteten Kutikula	114
9. Der Nachweis des Chitins mit Röntgenstrahlen	115
Zusammenfassung der Ergebnisse	117
B. Die Permeabilität der Kutikula von <i>Periplaneta americana</i> L.	120
1. Die Durchlässigkeit der Kutikula für Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur	120
2. Die Durchlässigkeit der Kutikula für E 605	123
3. Die Prüfung der E 605-Durchlässigkeit am lebenden Objekt	125
4. Injektion von E 605	127
5. Zusammenfassung und Besprechung der Ergebnisse	128
Literaturverzeichnis	129
Tafelanhang zu den Untersuchungen über den Aufbau der Insektenkutikula	137

Literaturübersicht und Problemstellung

Die Struktur und Zusammensetzung des Exoskelettes der Arthropoden wurde schon häufig untersucht. Die mannigfaltige Ausgestaltung dieses Panzers und die Schwierigkeit, die das harte und spröde Material der histologischen Untersuchung entgegensetzt, führten aber zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Im folgenden soll versucht werden, einen Überblick der wichtigsten älteren Arbeiten und des heutigen Standes der Kenntnisse über die Insektenkutikula zu geben.

a) Grundlegende ältere Arbeiten

Im Jahre 1823 veröffentlichte *Odier* die älteste bekannte Arbeit über das Insekten skelett. Er beschrieb die große Resistenz dieser „Kutikula“ gegenüber den verschiedensten Chemikalien und nannte ihren Hauptbestandteil „Chitin“. Neben diesen für die Insektenkutikula charakteristischen Stoff — einem Azetyl-Glukosamin (*Karrer* 1943) — stellte er andere „Inkrusten“ und Proteine fest, die sowohl die Färbung als auch die Härte der Kutikula bedingen sollen.

Weitere Untersuchungen über die Anordnung des Chitins in der Kutikula führten zu sehr verschiedenen Auffassungen. Grundlegend für die heutige Vorstellung ist die Arbeit von *Meyer* (1842), der in den Elytren von Käfern ein Balkensystem aus „glashellen Stäben“ beschreibt, die sich in einem Winkel von 45° oder 90° überkreuzen. Unter dem Deckglas gepresste Stäbe zeigen zahlreiche Anastomosen, in denen „sich auch eine recht bemerkbar angedeutete Längsstreifung erkennen läßt, worin vielleicht ein Hinweis auf feinere Formelemente der Stäbe liegt“.

Dagegen stellte *Biedermann* (1902/03) bei den verschiedensten Insekten einen Aufbau aus faserigen Lamellen fest. Nach seiner Ansicht ist das Exoskelett von Krebsen und Insekten gleich strukturiert. Auch *Kühnelt* (1928), der eine zusammenfassende Darstellung der älteren Literatur gibt, kommt zu dem Ergebnis, „daß im Insekten skelett trotz weitgehender Differenzierung immer derselbe prinzipiell gleichbleibende Aufbau aus drei Schichtkomplexen — Grenzlamelle, Pigmentschicht und Hauptlage“ (heute nach *Snodgrass* [Weber 1933] als Epi-, Exo- und Endokutikula bezeichnet) „— aufgefunden werden konnte“.

In der Grenzlamelle (= äußere Kutikula, Grenzhäutchen und Epikutikula) wies *Kühnelt* Fettsäuren und Cholesterin neben anderen fettartigen Substanzen nach und erkannte die Bedeutung dieser „Lipoidkutikula“ als Schutzeinrichtung gegen chemische und physikalische Außeneinflüsse, sowie ihre Analogie zur pflanzlichen Kutikula. (*Haeckel* [1857] beschrieb bei Krebsen diese „äußere Kutikula“ als ein in 37%iger Salzsäure unlösliches „Grenzhäutchen“.)

Die Beweglichkeit der Insekten wird nach *Kühnelt* dadurch erreicht, daß der harte Panzer weiche Zwischenmembranen besitzt. In diesen „Intersegmentalhäuten“ ist die unter der Epikutikula liegende „Pigmentschicht“ (= Exokutikula) entweder gar nicht ausgebildet oder in Form von kegelförmigen Scharnieren angeordnet, wodurch sie ihre Starrheit verliert.

b) Bildung und Aufbau der Insektenkutikula

Schon *Haeckel* (1857) erkannte die Epidermiszellen als Bildner des Insekten skelettes: „Die einfache Epithelschicht ist nämlich die wirkliche Matrix des außen auf ihr liegenden Chitinpanzers, welcher weiter nichts als das schichtweise nach außen abgesetzte und nach Art einer Kutikula erstarrte indurierte Sekret jener Zellen darstellt.“ Vielfach wurde auch eine Bildung der Kutikula durch Umwandlung von Epidermiszellen bzw. Zellteilen beschrieben (*Holmgren* 1902, *Plotnikow* 1904). Nach *Wigglesworth* (1948) gibt es keine strenge Scheidung zwischen der Ausscheidung und Umwandlung von Epidermiszellen im Verlauf der Kutikulabildung. Außerdem sind auch noch Dermaldrüsen und die Oenocyten an der Bildung der Kutikula beteiligt. Die Neuanlage der

Kutikula wiederholt sich bei jeder Häutung und wurde vor allem bei *Rhodnius* untersucht. Dieser Vorgang soll hier nach den Angaben von Wigglesworth kurz beschrieben werden.

Die Kutikula der Arthropoden besteht danach grundsätzlich immer aus einer äußeren, dünnen, chitinfreien Epikutikula und einer darunter liegenden weichen, farblosen Endokutikula, die aus Balken oder Lamellen zusammengesetzt ist. Der äußere Teil der Endokutikula kann aber oft hart, zerbrechlich und braun bis schwarz gefärbt sein und wird dann Exokutikula genannt.

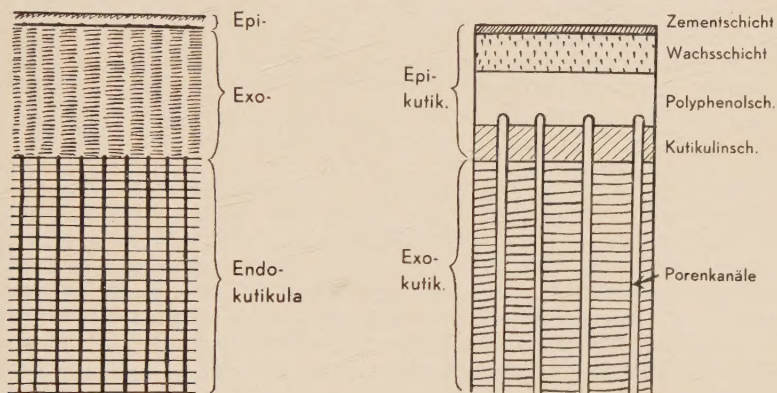


Abb. 1. Schematische Darstellung der Kutikulaschichten. (Nach Angaben aus der Literatur.)

Schon etwa drei bis vier Tage vor dem Abwerfen der Exuvie beginnt bei der tropischen Raubwanze *Rhodnius prolixus* die Bildung der neuen Kutikula. Die Epidermiszellen scheiden in Verbindung mit den Oenocyten eine aus polymerisierten Lipoproteinen bestehende „Kutikulin“-Schicht ab, die von Porenkanälen durchsetzt ist. In dem gleichen Maße, in dem die alte Endokutikula durch das fermenthaltige Sekret der Häutungsdrüsen abgebaut wird, wächst die neue Kutikula heran. Durch die Porenkanäle der Kutikulinschicht treten Dihydroxyphenole aus, die die „Polyphenol“-Schicht bilden. Wenige Stunden vor dem Abstreifen der Exuvie wird über diese beiden Schichten schließlich noch Wachs abgeschieden, das an der Oberfläche zu orthorombischen Mikrokristallen kristallisiert, die senkrecht zur Oberfläche angeordnet sind (Hurst 1950). Die durchschnittliche Dicke dieser Schicht von 0,2 bis 0,3 μ entspricht nach Beament (1948) etwa 30 Lagen orientierter Wachsmoleküle. Die weiche Wachsschicht erhält nach der Häutung einen Schutzüberzug, der von Dermaldrüsen gebildet wird und dessen Zusammensetzung nicht näher bekannt ist. Wegen ihrer Schutzfunktion wird diese Lage „Zement“-Schicht genannt (Abb. 1).

Bei *Rhodnius* wie auch bei den *Argasiden* (Lees 1947) besteht die Epikutikula aus diesen vier Schichten und ist durchschnittlich ein Mikron dick. Aber nicht bei allen Insekten konnte diese Zusammensetzung der Epikutikula

gefunden werden. Sie setzt sich z. B. bei *Periplaneta americana* (Richards und Korda 1950) und bei *Sarcophaga*-Larven (Dennell 1946) aus nur zwei Schichten zusammen (Abb. 2).

Schon während der Bildung der Epikutikula scheiden die Epidermiszellen die Fibrillen der Exokutikula aus. Die zunächst völlig weiche und weiße Schicht wird nach dem Abwerfen der Exuvie zum härtesten Teil der Kutikula. Mit der Härtung ist ein Dunklungsprozeß verbunden, der nach Danneel (1946) auf einem fermentativen Vorgang beruht und über drei Fermente zur Melaninbildung führt. Fraenkel und Rudall (1947) führen die Härtung und Dunklung der Exokutikula auf eine Reaktion von Derivaten des freien Blut-Tyrosins mit dem farblosen Protein der Kutikula zurück. Sie vergleichen diesen Prozeß mit der Gerbung des Kollagens durch Benzochinon, ein Vorgang, der in der englischen Literatur mit „tanning“ bezeichnet wird. Das nach diesem Prozeß hart und unlöslich gewordene Protein nennt Pryor (1940) „Sklerotin“. Die harte, dunkle Exokutikula erscheint strukturlos und besitzt zahlreiche Porenkanäle, die plasmatische Filamente oder Chitinfibrillen enthalten.

Erst nach dem Abwerfen der Exuvie und der Härtung der Exokutikula wird die weiche und farblose Endokutikula gebildet. Die aus Balkenlagen oder Lamellen bestehende Schicht wächst mehrere Tage und bei *Sarcophaga*-Larven nach Dennell (1946) durch das ganze Larvenleben hindurch an. Sie wird zum mächtigsten Teil der Kutikula und stellt nach Webb (1950) einen Chitin-Protein-Komplex dar; nach Fraenkel und Rudall (1947) sollen die beiden Stoffe abwechselnde Schichten oder ein Gitterwerk bilden. Während sich die Porenkanäle der Exokutikula nach Wigglesworth (1950) bei *Rhodnius* und nach Richards und Anderson (1942) bei *P. americana* in die Endokutikula fortsetzen, konnten Dennell (1946) bei *Sarcophaga* und Richards und Korda (1950) bei ihren umfassenden Untersuchungen über die Kutikula der Tracheen in dieser Schicht keine Porenkanäle nachweisen.

c) Chemische und physikalische Untersuchungen

Der chemischen Untersuchung des Insekten skelettes wurde seit der zufälligen Entdeckung des Glukosamins im Hummerpanzer durch Ledderhose (1876) immer mehr Beachtung geschenkt. Nach Zander (1897) gibt das Chitin, „wo immer es auch vorkommt, die gleiche Reaktion“. Schulze (1921) entwickelte eine Methode zum Nachweis von Chitin und Koch (1932) zeigte, daß das Chitin der Insekten-Kutikula nach exakter Aufhellung und Entfernung der Inkrusten mit dieser Methode immer die gleiche Reaktion gibt. Dadurch wurde die auf einen unterschiedlichen Ausfall der Reaktion begründete Ansicht, daß es mehrere Arten von Chitin gäbe, widerlegt.

Chitin ist ein Polysaccharid, das bei durchgreifender saurer Hydrolyse zu Essigsäure und Glukosamin (= Chitosamin) aufgespalten wird. Bei Behandlung mit starken Alkalien, wie sie bei einigen Nachweis-Reaktionen angewandt werden, entsteht Essigsäure und Chitosan, das dem Chitin noch sehr ähnlich ist (Karrer 1943).

Das von Cdier (1823) als Bestandteil der Insektenkutikula erwähnte Protein bestimmte Trim (1941) genauer. Er weist vor allem auf die große Ähnlichkeit mit dem Sericin der natürlichen Seide hin und unterscheidet zwei verschiedene Fraktionen. Als Bindeglied zwischen dem Chitin und Protein sollen schwefelhaltige Gruppen dienen, deren genaue Konstitution indessen nicht ermittelt werden konnte. Meyer (1938) vergleicht den Chitin-Protein-Komplex der Insektenkutikula mit dem Polysaccharid-Protein-Komplex der Pilze.

Durch polarisationsoptische (Schmidt 1947) und röntgenographische Untersuchungen (Gonell 1926, Meyer und Mark 1928, Meyer und Pankow 1935) wurde ein genaues Bild vom submikroskopischen Aufbau des Chitins gewonnen, das im wesentlichen dem der Zellulose gleicht.

d) Die Permeabilität der Kutikula

Mit dem Aufkommen der heute durch synthetische Stoffe weitgehend verdrängten Kontaktinsektizide Pyrethrum und Rotenon begann die Erforschung der Durchlässigkeit der Insektenkutikula. Eidmann (1922) hatte bereits an porenfreien Kutikulastücken festgestellt, daß ihre osmotische Durchlässigkeit der Dicke proportional ist. Die Untersuchungen von Hurst (1940/41) und Wigglesworth (1941) zeigten ferner, daß die Kutikula von außen nach innen durchlässiger ist als umgekehrt, und daß dieser Vorgang von der Luftfeuchtigkeit abhängt. Wesentlich für die Durchlässigkeit ist auch die Dielektrizitätskonstante und die Natur der im Versuch angewandten Flüssigkeiten, wie die Arbeiten von Lees (1940), Alexander, Kitchener und Briscoe (1944) und Beament (1948) gezeigt haben.

Bei einer bestimmten Temperatur verlieren die als Verdunstungsschutz fungierenden, gerichteten Wachsmoleküle der Epikutikula ihre kristalline Form, so daß die Durchlässigkeit der Kutikula stark ansteigt. Nach Wigglesworth (1950) ist diese „kritische Temperatur“ artkonstant und liegt zwischen 30° und 60° C. Auch durch Abreiben der Wachsschicht wird die Durchlässigkeit der Kutikula im gleichen Maße vergrößert. Diese zum großen Teil an Modellen durchgeführten Versuche zeigen die Bedeutung der Wachsschicht in der Epikutikula als Verdunstungsschutz, lassen aber die Beziehungen zwischen der Struktur und der Durchlässigkeit der Kutikula unberücksichtigt.

Der Eindringungsmechanismus der Kontaktinsektizide in den Insektenkörper wurde in den letzten Jahren vielfach untersucht. Für DDT nimmt Domenjoz (1944) an, daß es infolge seiner hohen Lipoidlöslichkeit durch die Kutikula diffundiert. Er vergleicht die Lipoide der Kutikula mit einer Gleitschiene, auf der das Gift an seinen Wirkungsort gelangen soll. Dagegen wird vielfach bestritten, daß die Kontaktinsektizide in der Lage seien, die Kutikula zu durchdringen (Lietz 1942, Roy und Gosh 1944, Potts und Vanderplank 1945, Wiesmann 1947). Nach Witt (1947) und anderen Autoren ist ein Eindringen von DDT und Hexachlorcyclohexan in den Insektenkörper durch die dicken Chitinplatten des Exoskelettes unmöglich, erfolgt vielmehr durch die Gelenkspalten, Sinnesorgane und Stigmen. Neueste amerikanische Untersuchungen mit radioaktiven Stoffen bestätigen, daß organische Phosphorsäureester in der Lage sind, die nicht sklerotisierten Intersegmentalhäute zu durchdringen (Roan, Fernando und Kearns 1950).

e) Problem und Fragestellung

Die Ergebnisse der früheren Autoren wurden mit den verschiedensten Methoden, Versuchstieren und Insektiziden gewonnen und lassen sich vielfach nicht miteinander vergleichen. Die vorliegende Arbeit soll daher den Eindringungsmechanismus für einen ganz bestimmten Fall, nämlich für das Kontaktinsektizid E 605, klären und so zur Kenntnis seiner Wirkungsweise beitragen.

Unerläßliche Voraussetzung dafür war die genaue Untersuchung der Struktur und Zusammensetzung der Kutikula des verwendeten Versuchstieres (*Periplaneta americana*). Obwohl sich aus der vorhandenen Literatur bereits ein

recht deutliches Bild vom Aufbau der Insektenkutikula ergibt (Abb. 1), sind die beschriebenen Unterschiede der Kutikulastrukturen bei den bearbeiteten Insektenarten doch so groß, daß eine Verallgemeinerung der Ergebnisse nicht möglich ist. Im Hinblick auf die Frage nach dem Eindringungsmechanismus war vor allem auf die Untersuchung der Porenkanäle, der Lipoide und des Chitins Wert zu legen. So gliedert sich die Arbeit in zwei Teile. Im ersten Abschnitt sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Wie ist die Kutikula von *Periplaneta americana* aufgebaut?
2. Gehen die Porenkanäle von den Epidermiszellen aus, oder sind sie nur in der Exokutikula enthalten?
3. Welche Substanzen sind in den Porenkanälen enthalten?
4. Wie sind die Lipoide, das Chitin und die Proteine in der Kutikula angeordnet?

Hierfür hat sich das U-V-Mikroskop als besonders gut geeignet erwiesen. Es wurde, soweit mir bekannt ist, noch nicht für derartige Untersuchungen der Insektenkutikula herangezogen.

Im zweiten Teil der Arbeit werden dann die Versuche zur Klärung des Eindringungsmechanismus von E 605 in den Insektenkörper beschrieben. Neben der Durchlässigkeit der homogenen Kutikula für Wasser und für E 605 interessierte vor allem die Bedeutung der Lipoide und Proteine für die Permeabilität der Kutikula.

Teil A.

Die Struktur und Zusammensetzung der Kutikula von *Periplaneta americana* L.

1. Material und Methoden

Wesentlich für die Durchführung der Arbeit war die Verwendung eines geeigneten Versuchstieres, das sowohl für die Untersuchung der Kutikulastruktur als auch für die Bestimmung ihrer Durchlässigkeit geeignet sein mußte. Diese Insektenart durfte keine allzu harte, aber auch keine zu dünne Kutikula besitzen; denn die einzelnen Schichten sollten klar erkennbar sein. Die Abdominalsegmente mußten ferner genügend groß sein, um isolierte Durchlässigkeitsbestimmungen zu ermöglichen. Da die Durchlässigkeit der homogenen Kutikula untersucht werden sollte, durfte die zu wählende Insektenart natürlich auch nicht behaart sein. Schließlich war für die vergleichenden Untersuchungen der verschiedenen Entwicklungsstadien eine hemimetabole Art zu bevorzugen. Aus allen diesen Gründen wurde *Periplaneta americana* L. ausgewählt und gezüchtet, um immer frisches und gleichbleibendes Material zur Verfügung zu haben. Im Verlauf der Untersuchungen ergab sich, daß sich die Zuchten zu langsam vermehrten (die Entwicklung dauert etwa 3 Jahre), und ich legte daher eine zweite von *Phyllodromia germanica* L. an (Entwicklungszeit etwa 3 Monate). Die Kutikula ist, wie meine Untersuchungen ergaben, bei beiden Arten grundsätzlich gleich aufgebaut; sie unterscheidet sich nur in der Dicke. Sämtliche Versuche wurden zuerst an der deutschen Küchenschabe erprobt und dann an der amerikanischen Art durchgeführt.

Außerdem verfügte ich über je eine Zucht von *Musca domestica* L. und *Aedes ägypti* Mg. Letztere benutzte ich zum biologischen Austesten der durch die Kutikula gedungenen Insektizidmengen. Für den Vergleich der Struktur und Zusammensetzung der Kutikula wurden Imagines von *Melolontha vulgaris* L. und *Rhodnius prolixus* Stähl. sowie Larven von *Sarcophaga carnaria* L. und *Lucilia caesar* L. herangezogen.

Da die einander widersprechenden Ergebnisse früherer Autoren auf die Anwendung verschiedener Chemikalien zur Fixierung, Aufhellung oder Mazeration zurückzuführen sind, galt es Methoden zu finden, die weder die chemische Zusammensetzung noch die Mikrostruktur der Kutikula veränderten. Nach Versuchen mit verschiedenen Fixierungs- und Einbettungsmitteln wählte ich die direkte Gefrierschnittmethode ohne Fixierung: Die frische von der Epidermis losgelöste Kutikula wurde auf dem Gefriertisch in einem Tropfen Wasser festgefroren und so lange mit Wasser umgeben, bis sie völlig in Eis eingebettet war. Bei nicht zu tiefer Kühlung fertigte ich mit gefrorenem Messer 5–10 μ dicke Schnitte an. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen betrug die Schnittdicke $\frac{1}{2}$ –1 μ . Die am Messer haftenden Schnitte wurden in Wasser aufgefangen und zur Entfernung der anhaftenden Kohlensäure mehrmals kurz gewaschen und direkt auf einen vorbereiteten Objektträger überführt. Zur Vermeidung der bei der japanischen Methode notwendigen Erwärmung, bei der die Lipide ihre Struktur verlieren können, wurden die Schnitte nach dem von *Apathy* angegebenen Verfahren aufgeklebt. An Stelle des dabei vorgeschriebenen 30%igen Alkohols verwendete ich mit gutem Erfolg destilliertes Wasser zum Ausbreiten der Schnitte auf dem Objektträger.

Bei diesem Verfahren werden bis auf Spuren von Protein keine Bestandteile aus der Kutikula herausgelöst. Wie vergleichende Untersuchungen mit anderen Einbettungs- und Schnittmethoden zeigten, treten durch das Gefrieren in Wasser keine mikroskopisch feststellbaren Strukturveränderungen auf, was besonders durch frische Handschnitte bestätigt wurde. Nur wenn das Präparat zu tief unterkühlt wurde, erschienen vornehmlich in der Exokutikula in unregelmäßigen Abständen Risse. Eine Veränderung in der Färbbarkeit konnte nicht festgestellt werden.

Die so hergestellten Präparate färbte ich mit verschiedenen Hämatoxylin-gemischen, mit mehreren Fettfarbstoffen, nach *Mallory* in der von *Heidenhain* angegebenen Modifikation, sowie nach *Flemming* mit Safranin-Gentianaviolett-Orange. Als Einbettungsmedien dienten Glycerin-Gelatine, Gummisirup und Caedax. Ein Aufhellen und Erweichen der Kutikula mit Chlordioxydlösungen (Diaphanol oder Chloratren) war nicht erforderlich und wurde nur zu Vergleichszwecken herangezogen.

Die Verteilung der Proteine in der Kutikula ließ sich mit einer von *Meyer* (1907) zum Nachweis von Plasmabrücken in der Botanik eingeführten Methode besser bestimmen als mit den üblichen Hämatoxylinfärbungen. Das Verfahren beruht darauf, daß das Plasma mit Jod gebeizt wird, wobei die Zellulosemembran durch Schwefelsäure zum Quellen gebracht und so schwerer anfärbbar gemacht wird. In saurer Methylviolettlösung geht der Farbstoff dann eine Verbindung mit dem jodhaltigen Plasma ein, so daß die Proteine blau bis blauviolett erscheinen. Die Methode eignet sich sowohl für kleine Stücke als auch für Gefrierschnitte. Die nahe Verwandtschaft des Chitins mit der Zellulose macht die guten mit der Methode erzielten Ergebnisse verständlich.

2. Der Aufbau der Kutikula von *Periplaneta americana* L.

An Hand schematischer Quer- und Längsschnitte durch die Kutikula des Abdomens von *P. americana* soll zunächst der Aufbau des Exoskelettes sowie die Verteilung der einzelnen Schichten erläutert werden. Die Epikutikula von *P. americana* läßt an der Oberfläche eine deutliche Schuppenskulptur erkennen und besteht aus nur zwei Schichten (Abb. 2), einer äußeren Wachsschicht und einer inneren aus polymerisierten Proteinen aufgebauten Lage. Bei der Doppelfärbung mit Hämatoxylin und einem Fettfarbstoff lassen sich die beiden Schichten gut nebeneinander darstellen. Die Wachsschicht ist etwa $0,6 \mu$ und die Proteinschicht $0,5 \mu$ dick. In beiden ist keine Struktur zu erkennen.

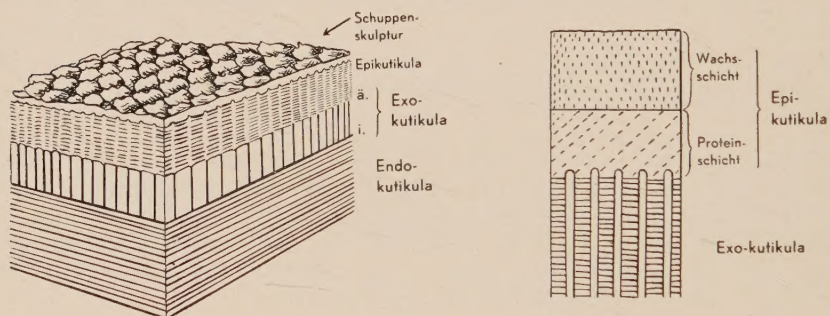


Abb. 2. Schematische Darstellung der die Kutikula von *Periplaneta americana* L. aufbauenden Schichten. Rechts eine vergrößerte Zeichnung der Epikutikula und der distalen Enden der Porenkanäle.

Die unter der Epikutikula liegende Exokutikula ist bernsteinfarbig und erscheint strukturlos (Tafel 1). Wie spätere Versuchsreihen (Seite 108) zeigen, besitzt sie aber die gleiche Grundstruktur wie die darunter liegende Schicht und enthält gleich ihr Porenkanäle (Tafel 3—5). Nach der Aufhellung mit Chloratren (Pfaff 1950) färben sich beide Schichten gleich an. Die einheitliche Grundstruktur und das Vorhandensein von Porenkanälen rechtfertigen die Zusammenfassung dieser beiden Schichten zu einer äußeren und einer inneren Exokutikula (Abb. 2). Nach der Definition von Wigglesworth (1950) wäre dagegen nur die äußere pigmentierte Zone als Exokutikula anzusprechen und der innere Teil müßte der Endokutikula zugerechnet werden. Da aber das Ausmaß dieser Pigmentierung — wie verschiedene Versuchsreihen zeigten — von Außeneinflüssen abhängig ist und da beide Zonen einheitlich aufgebaut sind, erscheint mir diese Definition ungeeignet. Außerdem spricht für die Zusammenfassung, daß die frisch gehäutete Kutikula von *Periplaneta americana* vor der Anlage der Endokutikula und dem Härtungsprozeß der äußeren Exokutikula noch keine mikroskopisch wahrnehmbaren Unterschiede zwischen diesen beiden Schichten zeigt.

Während die innere Exokutikula (Tafel 1) eine deutliche, senkrecht zur Oberfläche verlaufende Struktur aufweist und sich mit Azan rot anfärbt, ist die Endokutikula aus Lamellen aufgebaut, die nach der Azanfärbung blau erscheinen. Zu Hämatoxylin besitzt die Endokutikula weniger Affinität als die

innere Exokutikula, die reicher an Proteinen ist, während die Endokutikula mehr Chitin enthält. Auf die Verteilung der Proteine soll später eingegangen werden (Seite 106). Die Endokutikula wird von den Epidermiszellen in den ersten Tagen nach dem Abwerfen der Exuvie gebildet. Sie enthält nur noch in der äußersten Lamelle Porenkanäle, die aber, wie Tafel 5 zeigt, bedeutend größer sind als in der Exokutikula (Tafel 3—4). Die Tafeln 3—7 stellen Flächen-

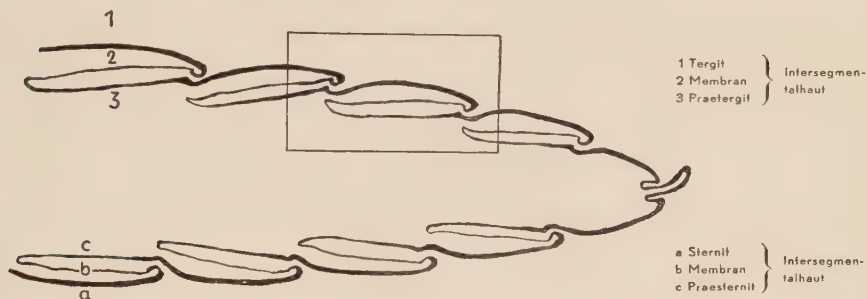


Abb. 3. Schematischer Längsschnitt durch das Exoskelett des Abdomens von *Periplaneta americana*, der die Anordnung der drei übereinanderliegenden Kutikulateile veranschaulicht.

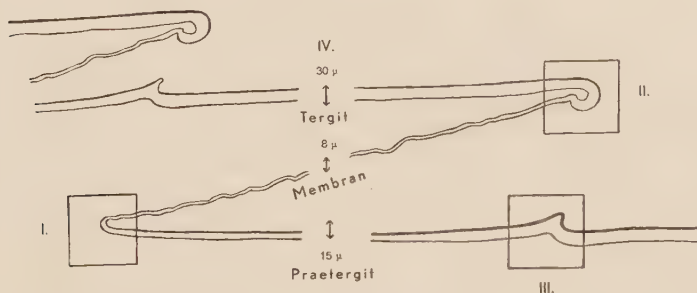


Abb. 4. Die vergrößerte Wiedergabe aus Abb. 3 zeigt die unterschiedliche Dicke der einzelnen Teile eines Segmentes. (Das Schema ist in vertikaler Richtung auseinandergezogen.)

schnitte durch die verschiedenen Schichten des Pronotums von *P. americana* dar und werden auf Seite 104 im Zusammenhang mit den Porenkanälen eingehender besprochen.

Die unterschiedliche Färbung der einzelnen Kutikulaschichten von *Periplaneta americana* durch Azan oder Hämatoxylin ermöglicht die Feststellung ihres Anteiles am Aufbau des Exoskelettes, der sich am besten an Hand eines Längsschnittes durch die Kutikula des Abdomens schildern läßt. Gemäß den Übersichtsskizzen (Abb. 3 und 4) besteht jedes Abdominalsegment aus drei verschiedenen, dachziegelförmig angeordneten Teilen, die sich nicht nur durch unterschiedliche Dicke (Abb. 4), sondern auch in ihrer Zusammensetzung unterscheiden (Abb. 5).

Der durch seine dunkle Färbung und Härte ausgezeichnete Teil des Exoskelettes wird als Tergit bzw. Sternit bezeichnet. In ihm sind alle Schichten der Kutikula am stärksten ausgebildet (Abb. 5, IV). Darunter liegt die weiche und farblose Membran. Ihre Beweglichkeit beruht auf dem Fehlen der harten äußeren Exokutikula und auf der Verdünnung der inneren Exo- und der Endokutikula (Abb. 5, I und II). Die innere Exokutikula ist in der Membran vielfach so dünn, daß sie im Quer- oder Längsschnitt nicht einwandfrei erkennbar ist. Im Flächenpräparat läßt sich dagegen ihr Vorhandensein an den Porenkanälen sicher nachweisen (Tafel 7). Zwischen dem Tergit bzw. Sternit und der Membran des vorhergehenden Segmentes liegt ein vorgeschobener Abschnitt, den ich als „Praetergit bzw. -sternit“ bezeichnen möchte (Abb. 5, I und III). Dieser Übergang vom Tergit (Sternit) zur Membran ist größtenteils farblos, da die

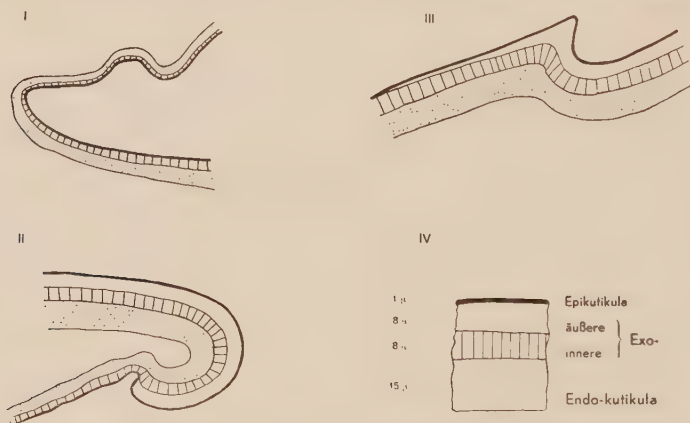


Abb. 5. Die in Abb. 4 mit I–IV bezeichneten Stellen stark vergrößert. Die zweischichtige Epikutikula ist als einfache Kontur gezeichnet. (Nähere Angaben im Text.)

äußere Exokutikula nur am Übergang zum Tergit (Sternit) ausgebildet ist. Auch die anderen Schichten werden zur Membran hin dünner. Die zweischichtige Epikutikula überzieht alle drei Teile in gleicher Dicke.

Die Kutikula von *Periplaneta americana* L. besteht also immer aus den drei Schichten: Epi-, Exo- und Endokutikula. Je nach der Funktion des Exoskelettes kann die äußere Exokutikula fehlen und die innere Exokutikula weniger mächtig ausgebildet sein, wie z. B. in der Intersegmentalhaut. Auf Grund dieser unterschiedlichen Verteilung der einzelnen Schichten im Exoskelett und deren charakteristischer Affinität zu bestimmten Farbstoffen kann man sowohl im Flächenpräparat wie auch im Schnitt die Schnittebene genau bestimmen. Die lateralen Verbindungen zwischen Sternit und Tergit besitzen zahlreiche kleine etwa 40 μ lange Borsten und zeigen sonst den gleichen Aufbau wie die Intersegmentalhäute. Bei männlichen und weiblichen Tieren sowie bei den verschiedenen Larvenstadien unterscheidet sich die Kutikula weder in ihrem Aufbau noch in ihrer Zusammensetzung.

3. Die pH-Werte der einzelnen, die Kutikula aufbauenden Schichten

Zur Erklärung der verschiedenen Farbreaktionen der Kutikulaschichten entwickelte Yonge (1932) folgende Methode zur Bestimmung der pH-Werte: Kleine vom Gewebe befreite Kutikulastücke werden in Pufferlösungen von

verschiedenen pH gelegt. Zu 20 ccm Pufferlösung fügt man 5 Tropfen einer 0,1-n-Lösung von $K_4Fe(CN)_6$ hinzu. Nach gründlichem Auswaschen werden die Kutikulastücke dann in eine schwache Lösung von $FeCl_3$ gebracht, das mit dem Anion $Fe(CN)_6$, welches sich mit den sauren Gruppen des Chitins verbunden hat, die typische „Berlinerblaureaktion“ ergibt. An in Glyzerin eingebetteten Handschnitten wird dann festgestellt, bei welchen Pufferlösungen noch eine Blaufärbung der einzelnen Schichten stattfindet. Der Umschlag von farblos zu blau entspricht dem isoelektrischen Punkt der Kutikula und wird durch den pH-Wert der Pufferlösung ausgedrückt.

Für die äußere Schicht aus dem Vorderdarm des Hummers, die der Epikutikula gleichzusetzen ist, ermittelte *Yonge* so einen pH-Wert von 5,1 und für die innere, der Endokutikula entsprechende Schicht den Wert 3,5. Auch bei ganz frisch gehäuteten Tieren und den kalkfreien Intersegmentalhäuten des Exoskelettes fand er die gleichen Werte. Diese weit auseinander liegenden isoelektrischen Punkte lassen auf eine verschiedene Zusammensetzung der Kutikulaschichten schließen. Nach der gleichen Methode bestimmte *Dennell* (1946) für die Kutikula von *Sarcophaga*-Larven die pH-Werte 5,3 und 3,4.

Die nach *Yonge* angeführte Methode änderte ich derart ab, daß an Stelle von Kutikulastücken Gefrierschnitte in die Pufferlösungen gebracht wurden. Dies gewährleistet ein gleichmäßiges Eindringen der Lösung in die Kutikula und spart gleichzeitig viel Zeit, da bereits eine Einwirkungsdauer von zehn Minuten genügt.

In der folgenden Tabelle sind meine Messungen mit den aus der Literatur bekannten Werten verglichen. Die Übersicht zeigt eine deutliche Übereinstimmung der pH-Werte für die einzelnen Schichten. Daraus ist zu entnehmen, daß jede Schicht eine charakteristische Zusammensetzung hat, die von der Insektenart unabhängig ist.

Die pH-Werte der einzelnen, die Kutikula aufbauenden Schichten

Species	Epi-	pH-Werte der Exo- Kutikula	Endo-
Werte aus der Literatur:			
Vorderdarm von <i>Homarus</i> nach Yonge	5,1		3,5
<i>Sarcophaga facultata</i> -Larve nach Dennell	5,3		3,4
Eigene Messungen:			
<i>Periplaneta americana</i>	5,3	4,15	3,3
<i>Periplaneta americana</i> , frisch gehäutet	5,1	4,0	—*)
<i>Rhodnius prolixus</i>	5,5	4,35	3,1
<i>Musca domestica</i> -Larve	5,3	4,1	3,3
<i>Sarcophaga carnaria</i> -Larve	5,2	4,3	3,45

4. Anzahl und Inhalt der Porenkanäle

Die im mikroskopischen Bild (Tafel 1) eines Kutikulaquerschnittes von *Periplaneta americana* L. auffallende, senkrechte Struktur der Exokutikula wird durch die für diese Schicht charakteristischen Porenkanäle hervorgerufen. Sie wurden schon früh als cytoplasmatische Filamente (*Leydig* 1864) oder

* Die Endokutikula war hier noch nicht ausgebildet.

Fasern (Tullberg 1881) beschrieben und sind in den letzten Jahren vielfach untersucht worden.

Bei *Sarcophaga*-Larven konnte Dennell (1946) in der von ihm als äußere Endokutikula bezeichneten Schicht (= innere Exokutikula) Porenkanäle nachweisen, die in der darunter liegenden inneren Endokutikula fehlen. Sie sind mit Ausnahme des inneren, trichterförmigen Teiles spiralg aufgerollt (vgl. Abb. 6) und haben einen Windungsabstand von annähernd $2,5 \mu$, der sich im Verlauf des Wachstums bis auf 9μ erhöht. Auf eine Zelle kommen etwa 50 bis 70 Porenkanäle, oder umgerechnet 15 000 auf 1 mm^2 .

Nach Untersuchungen von Wigglesworth (1950) und Richards und Anderson (1942) reichen dagegen die Porenkanäle von der Epidermis bis zur Epikutikula, in die sie wohl hineinragen, sie aber nicht durchdringen. Die elektronenoptischen Studien von Richards und Anderson über die Kutikula von *Periplaneta americana* ergaben für die Porenkanäle einen Durchmesser von $0,15 \mu$, der in den innersten 4μ bis 5μ trichterförmig bis zu $0,4 \mu$ anwächst; sie sind spiralg aufgerollt mit einer Windung von $0,25 \mu$. Auf eine Epidermiszelle kommen durchschnittlich 200 (25 bis 500) Porenkanäle oder 1,2 Millionen auf 1 mm^2 . Von der Gesamtoberfläche machen bei *Periplaneta americana* die Porenkanäle unter Zugrundelegung dieser Zahlen also nur 2,2 % und bei *Sarcophaga*-Larven 1,2 % aus.

An Flächenschnitten durch das Pronotum und die Abdominalsegmente von *P. americana* lassen sich die Porenkanäle auch im Lichtmikroskop deutlich erkennen. Infolge der kugeligen Oberfläche der Kutikula gehen die Schnitte durch verschiedene Schichten. Doch ist die Schnittebene auf Grund der unterschiedlichen Affinität von Exo- und Endokutikula zur Azanfärbung genau bestimmbar. Die im ungefärbten Präparat nur schwer kenntlichen Porenkanäle treten nach Azanfärbung und dem Plasmanachweis nach Meyer deutlich hervor. Für die Auszählung der gefärbten Porenkanäle benutzte ich ein eigens hergestelltes Netzkular von 20facher Eigenvergrößerung. Die Angaben sind Durchschnittswerte aus über 100 Messungen.

In der äußersten Exokutikula (Tafel 3) sind die Porenkanäle in ovalen bis sechseckigen Feldern von etwa 15μ Durchmesser mit $1,5 \mu$ breiten Zwischenräumen angeordnet. Diese felderartige Anordnung ist weiter innen, wie auch Dennell (1947) fand, nicht mehr zu erkennen. Die Anzahl der Porenkanäle pro Flächeneinheit nimmt nach innen immer mehr ab, bis in der Endokutikula, mit Ausnahme der äußersten Lamelle, keine Porenkanäle mehr nachweisbar sind (Tafel 3—6). Die Verteilung der Porenkanäle in der Kutikula von *Periplaneta americana* ist aus der folgenden Tabelle ersichtlich:

Kutikulaschicht	Anzahl der Porenkanäle pro mm^2	Tafel
Felder der äußersten Exokutikula	900 000	3
Äußere Exokutikula	820 000	
Grenze der äußeren zur inneren Exokutikula	650 000	4
Innere Exokutikula	550 000—300 000	6
Äußerste Lamelle der Endokutikula	300 000—200 000	5, 6
Membran	1 200 000	7
Pronotum frisch gehäutet	1 600 000—1 200 000	
<i>Melolontha vulgaris</i>	1 500 000—1 400 000	

Nimmt man als Durchschnittswert für die äußere Exokutikula 800 000 Porenkanäle pro mm^2 an, so läßt sich errechnen, daß sie bei einem Durchmesser von $0,15 \mu$ — wie Richards und Anderson (1942) angeben — 1,4 % der Gesamtfläche der Kutikula einnehmen. Da eine Verzweigung der Porenkanäle bei *P. americana* nicht nachgewiesen werden konnte, ist wohl anzunehmen, daß die Porenkanäle, deren Funktion beim Aufbau der Epikutikula und in der Härtung der äußeren Exokutikula liegt, nach der Anlage dieser Schichten in immer geringerer Zahl ausgebildet werden (Abb. 6). Da die Endokutikula erst nach der Häutung fertiggestellt wird, ist es somit durchaus verständlich, daß sie keine Porenkanäle mehr enthält. Das vergrößerte Lumen der Porenkanäle in der äußersten Lamelle der Endokutikula erinnert an die von Dennell (1946) und Richards und Anderson (1942) beschriebenen trichterförmigen Erweiterungen der Porenkanäle an ihrem inneren Ende (Abb. 6). Wahrscheinlich ist das

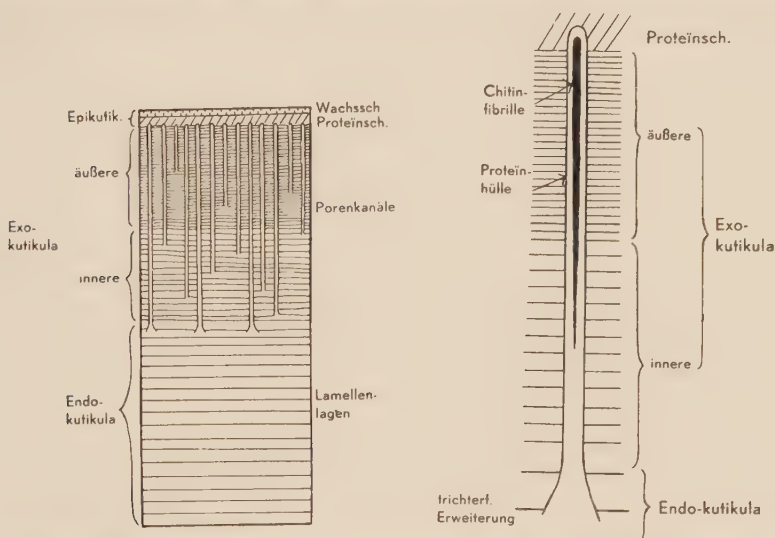


Abb. 6. Schematische Darstellung der Porenkanäle von *Periplaneta americana*. Rechts ist ein einzelner Porenkanal mit Chitin-fibrille wiedergegeben.

Vorhandensein der Porenkanäle in diesem Teil der Endokutikula darauf zurückzuführen, daß die äußerste Lamelle von den Epidermiszellen bereits gebildet wird, ehe der Stofftransport zur Dunkelung und Härtung der äußeren Exokutikula durch die Porenkanäle beendet ist.

Entsprechend ihrer Funktion enthalten die Porenkanäle ursprünglich Protoplasma, das mit dem Plasma der Epidermiszellen in direkter Verbindung steht. Bei dem Härtungsprozeß der äußeren Exokutikula wird das oxydierende Phenol durch die Porenkanäle ausgeschieden und reagiert dann mit dem schon vorhandenen Protein zu „Sklerotin“ (Pryor 1940, 1947). Sobald die Epikutikula bei *Sarcophaga*-Larven ihre volle Dicke erreicht hat (Dennell 1946), beginnt eine Chitinisierung der distalen Porenkanalinhalte, die mit zunehmendem Alter weiter fortschreiten soll. Der Inhalt der Porenkanäle geht aber keine Verbindung mit der Kanalwand ein, so daß eine Spalte frei bleibt, die auch weiterhin als Kanal für den Stofftransport dienen könnte (Dennell 1947).

Während *Richards* und *Anderson* (1942) bei *P. americana* eine Füllung der Porenkanäle mit einer Flüssigkeit beschreiben, deuten meine Färbeergebnisse eher auf einen plasmatischen Inhalt hin, der später auch noch Chitin enthalten kann. Bei frisch gehäuteten — noch völlig weißen — Tieren färben sich nämlich die Porenkanäle in Flächenpräparaten gleichmäßig rot, während sie schon wenige Tage nach der Häutung in den äußeren Zonen (äußere Endokutikula) mit Azan blau werden (Tafel 6), was auf eine Einlagerung von Chitin schließen läßt. Dennoch zeigt auch dann der Plasmanachweis nach *Meyer* deutlich das Vorhandensein von Protein an (Tafel 7). Dieser Befund wird durch meine Kontrollversuche mit Pepsin bestätigt. Während der Inhalt der Porenkanäle nach Pepsinverdauung noch mit Azan blau färbbar ist, fällt der Plasmanachweis nach *Meyer* jetzt negativ aus.

Auch im U-V-Licht sieht man auf Flächenpräparaten an der Grenze von der inneren zur äußeren Exokutikula die Porenkanäle als deutliche, kleine, dunkle Punkte, die nach Behandlung mit Pepsin weitgehend verschwinden. Da diese Untersuchungen mit einer Wellenlänge aus dem Absorptionsbereich der Proteine durchgeführt wurden, geht daraus eindeutig hervor, daß die Porenkanäle Plasma enthalten.

Aus allen diesen Beobachtungen ergibt sich, daß die Porenkanäle zunächst plasmatische Ausläufer der Epidermiszellen sind, die aber nur so lange von den Epidermiszellen gebildet werden, bis die Dunklung und Härtung der äußeren Exokutikula abgeschlossen ist. Die später angelegten Lamellen der Endokutikula enthalten daher auch keine Porenkanäle mehr. Nach Erfüllung ihrer eigentlichen Funktion — dem Stofftransport zur Bildung der Epikutikula und zur Härtung und Melanierung der äußeren Exokutikula — findet eine von außen nach innen fortschreitende Umwandlung oder Einlagerung von Chitin statt. Die feine Chitinfibrille bleibt von einer Proteinhülle umgeben (Abb. 6 rechts). Ob die Chitinfibrille die Porenkanäle in ihrer ganzen Länge durchzieht, konnte ich nicht mit Sicherheit entscheiden.

5. Die Proteinverteilung in der Kutikula

Das Vorhandensein von Proteinen in der Insektenkutikula wurde schon von *Oder* (1823) nachgewiesen und von mehreren Autoren bestätigt. Nach den Untersuchungen von *Richards* (1947) kommen in der Arthropoden-Kutikula immer Proteine vor, während Chitin gewöhnlich, aber nicht immer vorhanden ist. Die Kutikula von *Sarcophaga*-Larven enthält einen großen Anteil von wasserlöslichen Proteinen (*Fraenkel* und *Rudall* 1940), die besonders in der Exokutikula Tyrosin und Tryptophan enthalten (*Dennell* 1946). Die Anwesenheit dieser beiden Aminosäuren soll in direkter Beziehung zu der bevorstehenden Bildung der harten und dunklen Puppenkutikula stehen, wobei ein Teil der Proteine unter Verlust der Wasserlöslichkeit in „Sklerotin“ umgewandelt wird. Die Puppenkutikula (*Dennell* 1946) enthält bedeutend mehr Protein als die der Larve. Es kommt auch vor (*Richards* 1947), daß in der Kutikula einer Art mehrere verschiedene Proteine nebeneinander vorhanden sind.

Das Protein der Larvenkutikula von *Sarcophaga* wurde von *Trim* (1941) eingehend untersucht. Die physikalischen Eigenschaften, die Stickstoffverteilung und die Abwesenheit von Schwefel lassen das wasserlösliche Protein der Gelatine ähnlich erscheinen; jedoch enthält es beachtliche Mengen von Tyrosin und Tryptophan, während Gelatine nur Spuren dieser beiden Aminosäuren aufweist. *Trim* konnte zeigen, daß das Protein der Arthropoden-Kutikula dem Sericin der Seide gleicht, was durchaus verständlich ist, da sowohl die Spinn-

drüsen der Seidenraupen wie auch die kutikulabildenden Zellen epidermalen Ursprungs sind. Nach Entfernung dieses leicht löslichen Proteins I gewann *Trim* durch Extraktion des Rückstandes eine zweite Fraktion, die bedeutend reicher an Aminosucker ist und im Gegensatz zu dem Protein I Kohlehydrate und Schwefel enthält. Da auch der Chitintrückstand noch stickstofffreie Kohlehydrate und Schwefel enthält, nimmt *Trim* an, daß der Schwefel und die Kohlehydrate bei der Bindung des Proteins an das Chitin beteiligt sind.

Zur Aufklärung der Zusammensetzung der Kutikula von *P. americana* habe ich die Verteilung der durch *Trim* chemisch untersuchten Proteine in den einzelnen Schichten genauer bestimmt. Einen ersten Hinweis über die Proteinverteilung liefern die Färbungen mit Hämatoxylin, da sie die einzelnen Schichten unterschiedlich anfärben. Bedeutend klarere Ergebnisse wurden dann mit der oben beschriebenen (Seite 99) Methode zum Plasmanachweis von *Meyer* erzielt.

Wie bei den Hämatoxylinfärbungen ist auch hier die Affinität der einzelnen Schichten sehr ungleich. In der Endokutikula nimmt die Farbtintensität, d. h. der Proteingehalt von innen nach außen zu. Die schon erwähnte parallele Schichtung tritt hierbei sehr deutlich hervor, so daß man den Eindruck gewinnt, daß proteinreiche mit anderen Lamellen abwechseln. In der inneren Exokutikula treten die Porenkanäle auffallend blau gefärbt hervor, während sie in der nur ganz schwach anfärbbaren äußeren Exokutikula ohne Vorbehandlung nicht sichtbar sind. Dagegen zeigt nach Vorbehandlung mit Chloratren auch die äußere Exokutikula eine schwache Blaufärbung der Porenkanäle, was auf ihren proteinhaltigen Inhalt zurückzuführen ist.

In der neu angelegten Kutikula färben sich vor der Häutung die Exokutikula und die Porenkanäle intensiv blau. Schon wenige Stunden nach Abwerfen der Exuvie ist aber infolge der beginnenden Umwandlung der Proteine zu „Sklerotin“, die von außen nach innen fortschreitet, die äußere Exokutikula nicht mehr färbbar. Infolge des Härtungs- und Dunklungsprozesses reagieren die Proteine in dieser Schicht nicht mehr auf die Plasmafärbung nach *Meyer*.

Die in Bildung begriffene Endokutikula weist die gleiche Lamellenstruktur wie die des ausgewachsenen Tieres auf. Von der Epikutikula färbt sich nur die innere Schicht blauviolett. Sie ist strukturlos und enthält keine Porenkanäle. Durch eine vorhergehende Fettfärbung läßt sich deutlich zeigen, daß die Wachsschicht über dieser Proteinschicht liegt.

Meine vergleichenden Untersuchungen an *Rhodnius prolixus* und *Melolontha vulgaris*, sowie der Puppenkutikula von *Musca domestica*, ergaben grundsätzlich das gleiche Bild. Die Lamellen bzw. Balken (*Melolontha vulgaris*) werden von einer Proteinschicht umgeben. Außerdem tritt auch in den Porenkanälen Protein auf, das die Chitinfibrillen umhüllt. Obwohl sich die äußere Exokutikula beim vollständig ausgebildeten Insekt dem Plasmanachweis gegenüber negativ verhält, lassen also die Versuche mit frisch gehäuteten Tieren, ebenso nach Aufhellung der Kutikula mit Chloratren, den hohen Proteingehalt dieser Schicht eindeutig erkennen.

6. Extraktionsversuche

Die im vorigen Kapitel beschriebenen Farbreaktionen vermitteln bereits ein recht klares Bild vom Aufbau der Kutikula. Eine Vertiefung erfahren diese Ergebnisse durch die Extraktion bestimmter Stoffe, so daß bei anschließender Färbung ihre Lokalisation genau bestimmt werden kann. Für die Frage nach der Durchlässigkeit der Insektenkutikula ist besonders die Protein- und Fett-

verteilung von Bedeutung. Durch fermentative Proteinverdauung und Extraktion der Fette mit Chloroform konnten daher weitere Einblicke in die Struktur der Kutikula von *Periplaneta americana* gewonnen werden.

a) Verdauung der Proteine mit Pepsin

Pepsin und Trypsin werden in der Histologie zur Schnittverdauung vielfach angewandt und zeigen in gewisser Hinsicht eine antagonistische Wirkung. Aus einer von Kleiss (1950) nach der Literatur zusammengestellten Tabelle geht hervor, daß beide Fermente Chitin nicht abbauen. Die von ihm empfohlenen Lösungen habe ich zur Verdauung von Kutikulastücken und -schnitten angewandt. Vergleichende Versuchsreihen zeigten aber keinen Unterschied in der Wirksamkeit von Pepsin und Trypsin, so daß ich hier immer nur von Pepsin sprechen werde. Infolge der langsamen Durchdringung der Kutikulastücke benutzte ich nach Möglichkeit Schnitte, die nach der beschriebenen Methode (Seite 99) hergestellt waren. Die Verdauung wurde bei 37°C in dreimal erneuerter Lösung vorgenommen. Anschließend wurden die Schnitte gewässert und nach der Plasmanachweis-Methode von Meyer behandelt oder mit Azan gefärbt.

Bei mit Azan gefärbten Schnitten verschwindet nach der Pepsinverdauung die senkrechte, rot gefärbte Struktur (Porenkanäle) der inneren Exokutikula (Tafel 1), an deren Stelle eine deutliche, kompakte Lamellenstruktur (Tafel 1) sichtbar wird. Sie färbt sich wie auch die Endokutikula blau. Um diese Lamellenstruktur klarer hervorzuheben, wurden schräggeführte Schnitte hergestellt. Dadurch werden die einzelnen Lagen weiter auseinander gezogen und zwischen den Lamellen Querverbindungen sichtbar (Tafel 2). Die im unbehandelten Präparat deutlich sichtbare senkrechte Streifung der inneren Exokutikula wird demnach nur durch die plasmatische Füllung der Porenkanäle hervorgerufen, während die eigentliche Grundstruktur wie bei der Endokutikula aus dicht gepackten Lamellen besteht.

Bei Anwendung des Plasmanachweises nach Meyer kommt diese Strukturveränderung weniger deutlich zum Ausdruck. Auch nach der Pepsinverdauung bleibt vielmehr eine schwache Blaufärbung in beiden Schichten erhalten, die die gleiche Struktur erkennen läßt wie bei unbehandelten Präparaten. Da diese Restfärbung auch nach längerer Behandlung mit Pepsin und Kombination mit Trypsin nicht verschwindet, muß angenommen werden, daß nicht alle Proteine durch diese Fermente abgebaut werden können. Vielleicht besteht hier eine Parallele zu den Ergebnissen von Trim (1941), wonach die nicht verdaulichen Proteine ein Bindeglied zwischen dem löslichen Protein und dem Chitin darstellen. Dagegen ist die chitinfreie innere Schicht der Epikutikula nach der Verdauung nicht mehr nachweisbar.

b) Extraktion der Lipoide

Nach Wigglesworth (1950) und zahlreichen anderen Autoren ist die Wachsschicht der Epikutikula in Chloroform löslich. Auch Richards und Korda (1948) benutzten in ihrer Arbeit über die extrahierte Insektenkutikula von *Periplaneta americana* zur Fettextraktion Chloroform und Azeton. Nach ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen wird nur die Wachsschicht der Epikutikula herausgelöst, während in der übrigen Kutikula keine Veränderung eintritt.

Ich extrahierte daher Kutikulastücke und -querschnitte von *Periplaneta americana* mit Chloroform 12 Stunden lang in der Soxhlet-Apparatur. Anschließend wurden die durch vorsichtige Erwärmung vom Chloroform befreiten

Präparate mit verschiedenen Fettfarbstoffen, mit Azan oder nach *Meyer* gefärbt. Die Wachsschicht der Epikutikula ist nach der Extraktion nicht mehr nachweisbar. Die anderen Schichten zeigen nur eine geringfügige Veränderung gegenüber den unbehandelten Schnitten. Nach der Azanfärbung und dem Plasmannachweis nach *Meyer* erscheint die Lamellenstruktur der Endokutikula etwas verschwommen. Wird die Chloroformextraktion mit der Pepsinverdauung kombiniert, so verschwindet die schwache Blaufärbung, die nach einfacher Pepsinverdauung erhalten blieb, vollkommen. Außerdem tritt die Lamellenstruktur der inneren Exokutikula und Endokutikula kontrastreicher hervor.

Hieraus ergibt sich, daß die zwischen dem löslichen Protein und dem Chitin lokalisierten unverdaulichen Proteine nach der Behandlung mit Chloroform fermentativ abgebaut werden können. *Biedermann* (aus *Bamann* und *Myrbäck* 1941) wies nämlich nach, daß keine Verdauung der lipoidreichen Proteine der Leber durch Pepsin oder Trypsin stattfindet. Wird dagegen das Lipoid durch Extraktion entfernt, so wird das protoplasmatische Eiweiß leicht verdaulich. Daraus folgere ich, daß in der Insektenkutikula ein ähnliches Lipoprotein zwischen dem Chitin und dem leicht verdaulichen Protein eingelagert ist.

Die Verdauungs- und Extraktionsversuche wurden vergleichsweise auch an *Melolontha vulgaris*, *Rhodnius prolixus* und der Puppenkutikula von *Musca domestica* durchgeführt. Die im wesentlichen gleichen Ergebnisse werden im Zusammenhang mit den U-V-Untersuchungen in einem späteren Kapitel besprochen.

c) Gewichtsbestimmungen

Häufig wird die Insektenkutikula als Chitin bezeichnet, obwohl unter dieser Bezeichnung nur ein einzelner, chemisch und physikalisch genau definierter Bestandteil des Arthropodenskelettes zu verstehen ist. Mengenmäßig steht es beim Aufbau der Kutikula sogar erst an zweiter Stelle. *Richards* (1947) betrachtet nicht das Chitin, sondern das Protein als die Grundsubstanz des Insekten skelettes. Während in der Kutikula bei allen von ihm untersuchten Arthropodenarten Proteine in größeren Mengen vorkommen, schwankt der Chitinhalt von 0—60 %. Nach *Wigglesworth* (1948) enthält die Insektenkutikula 30—40 % Wasser, 20—30 % Chitin, 20—30 % Protein und 3—5 % Asche, die im wesentlichen aus Kalziumsalzen besteht. Bis zu 60 % des Trockengewichtes der Endokutikula sind Chitin, während die Proteine in erster Linie in der Exokutikula lokalisiert sind. Harte und sklerotisierte Insekten skelette enthalten oft weniger Chitin als die weiche, weiße Kutikula der Larven und Intersegmentalhäute, manchmal sogar gar keines.

Im Verlauf seiner Untersuchungen über den „Nachweis des Chitins in tierischen Skelettsubstanzen“ entfernte *Koch* (1932) die Inkrusten der Kutikula mit Chlordioxydlösungen und bestimmte ihren Anteil in Abdominalskleriten von *P. americana* mit 62 %, in den Elytren von *Melolontha vulgaris* mit 52 % und bei *Pieris brassicae* mit 36 %. Für den Maikäferpanzer gibt *Kunicke* (1925) 75 % und für Heuschrecken 80 % Inkrusten an.

Das in der Kutikula vorhandene leicht lösliche Protein und der hohe Wassergehalt erfordern als Voraussetzung für Gewichtsbestimmungen eine sehr sorgfältige Präparation. Ich habe daher frische Kutikulastücke von *Periplaneta americana* zur Bestimmung ihres Wassergehaltes in feuchtigkeitsgesättigter Luft durch vorsichtiges Schaben von der anhängenden Epidermis befreit. Zur Wägung wurde die Kutikula so lange in einem evakuierten, mit wasserfreier Schwefelsäure beschickten Exsikkator gelassen, bis Gewichtskonstanz einge-

treten war; die Differenz stellte dann den Wassergehalt dar. Der Sklerotinhalt wurde in der Form bestimmt, daß die nacheinander vom Protein und Lipoid befreite Kutikula mit Chloratren so lange aufgehellt wurde, bis sie glasig durchsichtig erschien. Die danach verbleibende Restsubstanz ist reines Chitin, wie durch Röntgendiagramme nachgewiesen werden konnte. (Die Röntgenaufnahmen werden in einem besonderen Kapitel besprochen.)

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Verteilung der am Aufbau der Kutikula von *Periplaneta americana* beteiligten Substanzen. Die angegebenen Werte beziehen sich auf das Pronotum und sind Mittelwerte aus sieben Versuchsreihen mit je 30–50 Halsschilden.

Prozentuale Verteilung der die Kutikula von *Periplaneta americana* aufbauenden Substanzen:

	Frischgewicht %	Trockengewicht %	Nach Wigglesworth ¹
Wassergehalt	37	—	30—40
Protein I	35	55	} 20—30
Protein II	2	3	
Sklerotin	7	12	—
Lipoide	4	6	—
Chitin	15	24	20—30
Asche	—	—	3—5

7. Polarisationsoptische und elektronenmikroskopische Beobachtungen

Die Doppelbrechung der Insektenkutikula wurde schon von Meyer (1842) beobachtet. Chitin besitzt eine negative Eigendoppelbrechung, die von einer stärkeren positiven Stäbchen- oder Formdoppelbrechung überlagert ist (Möhrling 1926, Schmidt 1924 und 1947). Durch Azetylierung oder Nitrierung des Chitins wird die negative Eigendoppelbrechung größer als die positive Formdoppelbrechung, so daß eine Umkehrung des Vorzeichens eintritt: ein von Schmidt (1947) entwickeltes Verfahren zum mikroskopischen Nachweis von Chitin.

Im polarisierten Licht ließ sich bei eigenen Versuchen die Lamellenstruktur der Insektenkutikula besonders deutlich zeigen. Nicht nur die Endokutikula leuchtet zwischen gekreuzten Nikols hell auf, sondern auch die innere Exokutikula. Nach der Aufhellung mit Chloratren zeigt die äußere Exokutikula die gleiche Formdoppelbrechung, woraus geschlossen werden kann, daß auch in dieser Schicht die Chitinfibrillen, wie in der inneren Exo- und Endokutikula, in Lamellenstruktur angeordnet sind. Die gleiche Beobachtung konnte ich bei *Rhodnius prolixus* machen, deren Endokutikula sehr stark doppelbrechend ist, ferner bei *Melolontha vulgaris* und bei der Puppenkutikula von *Musca domestica*. Im unbehandelten Querschnitt ist die Doppelbrechung dieser Zone infolge der starken Pigmentierung nicht zu erkennen.

Nach der Extraktion der Lipoide aus der äußeren Epikutikula verschwindet eine äußere, dünne, doppelbrechende Schicht, die im unbehandelten Präparat hell aufleuchtet. Die Doppelbrechung aller proteinhaltigen Kutikulaschichten

¹ Die Angaben von Wigglesworth sind zum Vergleich beigelegt, obwohl sie allgemeiner Art sind und sich nicht auf eine bestimmte Spezies beziehen.

läßt sich durch Überfärben mit Hämatoxylin überdecken. Es bleibt dann nur der schmale, äußere Lichtstreifen der Wachsschicht bestehen. Dieser Befund bestätigt die auf Seite 95 beschriebene, gerichtete Anordnung der Lipoidmoleküle in der äußeren Epikutikula.

Zur genauen Bestimmung der Lamellenstruktur wurde versucht, elektronenoptische Aufnahmen von Kutikulaquerschnitten herzustellen. Die mit dem Gefriermikrotom angefertigten Schnitte von weniger als einem Mikron Dicke sind für Elektronenstrahlen aber nicht dünn genug. Eine zweite Schwierigkeit liegt darin, daß die Präparate sich im Strahlengang sehr schnell verändern. Diese Veränderung rührt wahrscheinlich von dem Verdampfen gewisser Kutikulabestandteile — vielleicht der Lipoide — her. Deshalb konnten nur wenige Aufnahmen angefertigt werden, von denen einige aber deutlich erkennen ließen, daß auch die äußere Exokutikula eine lamellenartige Grundstruktur besitzt. Sie erscheint sehr viel kompakter als die der inneren Exokutikula. (Die auf Grund der oben erwähnten Schwierigkeiten unscharfen Bilder sollen hier nicht wiedergegeben werden.)

8. Untersuchungen im ultravioletten Licht

Da ich infolge der technischen Schwierigkeiten mit dem Elektronenmikroskop keine befriedigenden Ergebnisse erzielte, setzte ich die Untersuchungen der Kutikulastruktur und -zusammensetzung mit dem U-V-Mikroskop fort. Während im elektronenoptischen Bild die Massendichte des Objektes zur Geltung kommt, wird eine mit ultraviolettem Licht hergestellte Aufnahme durch die spezifische Absorption der in dem Objekt vorhandenen Substanzen bestimmt. Infolge der kürzeren Wellenlänge des ultravioletten Spektrums erreicht man mit dem U-V-Mikroskop bei gleicher Apertur das doppelte Auflösungsvermögen wie mit dem Lichtmikroskop und dementsprechend auch eine stärkere Vergrößerung.

Möglichst dünne Querschnitte und Flächenpräparate der Kutikula von *Periplaneta americana*, *Melolontha vulgaris* und *Rhodnius prolixus* wurden ungefärbt zwischen Quarzobjektträger und -deckgläschen in Glycerin-Gelatine eingebettet. Bis zu einer Wellenlänge von $250\text{ m}\mu$ erwies sich die Kutikula als durchlässig genug, während bei noch kürzeren Wellenlängen alles Licht absorbiert wurde. Im U-V-Licht untersuchte Präparate sind schon 24 Stunden später unbrauchbar; eine Erscheinung, die wahrscheinlich auf eine durch die starke Strahlung verursachte Ausfällung der Proteine zurückzuführen ist.

a) An Querschnitten

Zur Bestimmung der geeigneten Wellenlänge wurden von ein und demselben Präparat Aufnahmen bei den verschiedenen Wellenlängen hergestellt. Während bei $\text{Al } 390\text{ m}\mu$ das Bild dem der Tageslichtaufnahme weitgehend gleicht, findet man bei $\text{Mg } 280\text{ m}\mu$ (Tafel 8) ein Absorptionsmaximum der Proteine. Eine spezifische Absorption des Chitins konnte indessen auf diesem Wege nicht festgestellt werden. Die vollständige Undurchlässigkeit der Präparate bei Wellenlängen unter $250\text{ m}\mu$ läßt aber vermuten, daß in diesem Bereich das Absorptionsmaximum des Chitins liegt. Bei der Überprüfung mit dem U-V-Spektrographen ergab reines Chitin eine gleichmäßig ansteigende Absorption mit abnehmender Wellenlänge.

Die in der Arbeit wiedergegebenen U-V-Aufnahmen sind Originalabzüge und zeigen mit Ausnahme der Querschnitte durch das Pronotum von *Melolontha vulgaris* (Tafel 17) eine 2400fache Vergrößerung.

Ein Vergleich der auf den Tafeln 8 und 8a wiedergegebenen Aufnahmen eines Querschnittes durch das Pronotum von *Periplaneta americana* läßt erkennen, daß die Wellenlängen Cd 275 m μ und Zn 250 m μ am geeignetsten sind. Auffallend ist die starke Absorption der äußeren Exokutikula bei allen Wellenlängen. Sie ist im wesentlichen von den Proteinen (Sklerotin) bedingt. Aus den dunklen Zonen der Kutikula bei Mg 280 m μ ist die Verteilung der Proteine, deren Absorptionsmaximum in diesem Bereich liegt, klar ersichtlich. (In diesem Bereich liegt das Absorptionsmaximum verschiedener Aminosäuren, besonders das des Tyrosins.) Die starke Absorption macht aber diese Wellenlänge für genauere Strukturuntersuchungen ungeeignet. Die Wellenlängen Zn 330 m μ und Cd 257 m μ zeigen keine Besonderheiten. Auch bei der Wellenlänge Cd 275 m μ fällt die Hauptabsorption noch in den Bereich der Proteine, doch läßt sich hier infolge der Helligkeit dieser Cadmium-Linie (275 m μ) die Anordnung der Proteine gut erkennen. Bei Zn 250 m μ tritt bereits die waagerechte Grundstruktur der inneren Exokutikula hervor. Hier kommt also auch schon die Absorption des Chitins zur Geltung.

Die Lamellenstruktur der Endokutikula tritt bei allen Wellenlängen deutlich hervor, und die nach außen steigende Absorption zeigt den geringen Proteingehalt der zuletzt ausgebildeten Lamellen an. Dadurch werden die schon früher mit dem Plasmanachweis nach Meyer erhaltenen Ergebnisse bestätigt. Auch der plasmatische Inhalt der Porenkanäle der inneren Exokutikula wird durch die mit U-V-Licht hergestellten Aufnahmen bewiesen (Tafel 9).

Die Gegenüberstellung eines unbehandelten und eines mit Pepsin verdauten Querschnittes (Tafel 9) läßt die lamellenartige Grundstruktur der inneren Exokutikula deutlich erkennen, deren Porenkanäle nach Pepsinverdauung vollkommen verschwinden. Sie scheinen also keine Wand zu besitzen, sondern stellen nur protoplasmatische Filamente dar, die in diesem Bereich auch keine Chitinfilbrillen enthalten. Dieser Befund bestätigt die in dem Kapitel über die Porenkanäle beschriebenen Färbeergebnisse.

Nach der Extraktion mit Chloroform erscheinen sowohl die Porenkanäle als auch die Lamellen (Tafel 10 oben) der Endokutikula sehr viel weniger deutlich als in den vorherigen Aufnahmen. Die Strukturen machen einen verschwommenen Eindruck, der im U-V-Licht anschaulicher ist als im gefärbten lichtmikroskopischen Präparat. Nach zusätzlicher Verdauung mit Pepsin tritt auch hier die Lamellenstruktur der inneren Exokutikula und Endokutikula deutlicher hervor (Tafel 10 unten). Ein Vergleich des mit Pepsin verdauten Querschnittes (Tafel 9) mit dem extrahierten und fermentativ abgebauten (Tafel 10) zeigt, daß die Proteine ohne vorhergehende Chloroformbehandlung nicht vollständig entfernt werden können.

Dieselben Extraktions- und Verdauungsversuche wurden auch an Querschnitten durch das Pronotum von *Melolontha vulgaris*, *Rhodnius prolixus* und durch die Puppenkutikula von *Musca domestica* durchgeführt. Während die Kutikula der Puppe die gleichen Strukturverhältnisse aufweist wie bei *Periplaneta americana*, treten beim Maikäfer und bei *Rhodnius prolixus* die in den Elytren von Käfern vielfach beschriebenen Balkenlagen auf. Jeder Balken ist von einer Proteinhülle umgeben, wogegen die Lipoproteine vornehmlich in ihrem Inneren gelagert sind (Tafel 17 bis 18). Die einzelnen, die Balken aufbauenden Elemente sind in diesen Aufnahmen nicht zu erkennen und sollen im Zusammenhang mit den Flächenbildern besprochen werden. Eine Unterscheidung in eine innere und eine äußere Exokutikula kann bei *Melolontha vulgaris* nicht getroffen werden, da hier die gesamte Exokutikula sehr stark

mit Melanin durchsetzt ist. Die im oberen Teil der auf Tafel 18 wiedergegebenen Aufnahme sichtbaren Porenkanäle konnten in lichtmikroskopischen Präparaten angefärbt und ausgezählt werden (Seite 104).

Auch die lamellenartige kompakte Struktur der Exokutikula von *Melolontha vulgaris* ist auf Tafel 18 zu sehen. Sie liegt in der gleichen Größenordnung wie bei *Periplaneta americana* und bedingt die scheinbar perlschnurartige Anordnung der Porenkanäle. Daraus ist bereits ersichtlich, daß keine großen Unterschiede in der Grundstruktur der verschiedenen Kutikulae bestehen können.

b) An Flächenpräparaten

Bei der Präparation der mit Pepsin verdauten Kutikula fiel mir wiederholt auf, daß sich die Endokutikula von der Exokutikula nach dieser Vorbehandlung leicht ablösen läßt. Schon nach kurzer Einwirkungsdauer des Fermentes konnte ich die Endokutikula des Pronotums von dem übrigen Komplex abziehen. Sie ist ein dünnes, weiches und farbloses Häutchen, das im Lichtmikroskop nur eine schwach angedeutete Streifung erkennen läßt. Da diese Häutchen kein Sklerotin enthalten, sind sie für U-V-Licht durchlässig und wurden deshalb zur weiteren Untersuchung der Feinstruktur benutzt.

Im Absorptionsbereich der Proteine angefertigte Flächenaufnahmen lassen eine deutliche Fibrillenstruktur erkennen (Tafel 11 bis 12). Zwischen den Fibrillen erscheinen kleine helle Punkte, die auch in dem Querschnittspräparat auf Tafel 9 vorhanden sind. Sie konnten nicht mit Gewißheit gedeutet werden, doch steht fest, daß sie nicht als Porenkanäle angesprochen werden können. Vielleicht kommen sie dadurch zustande, daß die Fibrillen sich in den einzelnen Lagen überkreuzen, wie es die Tafel 12 zeigt. In diesen Aufnahmen sind zwei übereinander liegende Lamellenlagen getroffen, deren Fibrillen sich in einem Winkel von etwa 75° überschneiden. Durch die stärkere Lichtabsorption an den Schnittpunkten der Fibrillen könnte das perlschnurartige Bild zustande kommen. Die Porenkanäle erscheinen dagegen im U-V-Licht bedeutend größer.

Auch nach Extraktion der Kutikula mit Chloroform läßt sich die Endokutikula teilweise von der Exokutikula abziehen. Im Absorptionsbereich der Proteine ($280\text{ m}\mu$) ist in der Endokutikula keine Struktur nachzuweisen. Wird dagegen eine kürzere Wellenlänge ($250\text{ m}\mu$) angewandt, so tritt die Fibrillenstruktur schwach zutage. Daraus geht hervor, daß in der, nach der Extraktion mit Chloroform homogen erscheinenden, Lamellenlage das Chitin seine fibrilläre Anordnung beibehält, während die Lipoproteine ihre Struktur verlieren. Leider konnte ich mit Wellenlängen unter $250\text{ m}\mu$ keine Aufnahmen erhalten, da diese Linien zu lichtschwach und die Objekte zu dick waren. Dadurch war ich auf die Wellenlänge $250\text{ m}\mu$ angewiesen, die aber von Chitin und Protein fast gleich stark absorbiert wird. Es ist also verständlich, daß die in Protein eingelagerten Chitinfibrillen bei dieser Wellenlänge nur schwache Konturen geben können.

Erst nach zusätzlicher Verdauung der Proteine mit Pepsin werden die Chitinfibrillen auch bei dieser Wellenlänge gut sichtbar (Tafel 13). Bei einem Vergleich mit den vorigen Aufnahmen (Tafel 12) gewinnt man jedoch den Eindruck, daß die Fibrillen durch die Entfernung der Proteine und der Lipoide ihre strenge Anordnung verloren haben. Es ist möglich, daß die Chitinmoleküle, die wie alle Polysaccharide zur Polymerisation neigen, nach der Entfernung der übrigen Kutikulabestandteile größere Ketten bilden und dabei vernetzen. Die Reinheit des nach dieser zweimaligen Behandlung erhaltenen Chitins

erweist das Röntgendiagramm (Tafel 14); sie liegt über 95 %. (Die Röntgendiagramme werden im nächsten Kapitel besprochen [Seite 115].)

Der Aufbau der Kutikula aus Chitinfibrillen ist in den Flächenaufnahmen von der Endokutikula des Maikäfers besonders deutlich (Tafel 19). Infolge der nur unvollständig durchgeführten Verdauung mit Pepsin sind noch Reste von Protein erhalten geblieben, die in der Abbildung als undurchlässige Stellen erscheinen. Dadurch treten die einzelnen Balken kräftig hervor. Sie zeigen einen quadratischen Querschnitt (Tafel 18) mit einer Kantenlänge von etwa $6-8\ \mu$ und überkreuzen sich in einem Winkel von annähernd 75° . Die die Balken aufbauenden Chitinfibrillen sind bedeutend länger als bei *Periplaneta americana*, besitzen aber etwa den gleichen Durchmesser von weniger als $0,5\ \mu$. Wie die Aufnahme einer einzigen Balkenlage aus der Endokutikula des Pronotums von *Rhodnius prolixus* zeigt (Tafel 20), ist die Fibrillenstruktur nach vollständigem fermentativem Abbau der Proteine nicht mehr so gut zu erkennen. Die sich überkreuzenden Balken und die Chitinfibrillen liegen bei *Rhodnius prolixus* in der gleichen Größenordnung wie bei *Melolontha vulgaris*.

Die kleinsten, mikroskopisch wahrnehmbaren Bauelemente der Kutikula sind also die Chitinfibrillen. Sie sind von Lipoprotein und Protein umgeben und können zu Lamellen — bei *Periplaneta americana* und der Puppenkutikula von *Musca domestica* — oder Balken — bei *Melolontha vulgaris* und *Rhodnius prolixus* — zusammengelagert sein. Beim Maikäfer finden sich beide Formen nebeneinander; die Endokutikula ist aus Balken aufgebaut und die Exokutikula aus Lamellen (Tafel 18), wie schon auf Seite 113 gezeigt wurde. Obwohl die Fibrillen in den Balken bedeutend länger sind als in den Lamellen von *Periplaneta americana*, überkreuzen sie sich in beiden Fällen in dem gleichen Winkel und besitzen den gleichen Durchmesser.

c) An der frisch gehäuteten Kutikula

Zur Zeit der Häutung von *Periplaneta americana* sind nur die Epi- und die Exokutikula ausgebildet (Tafel 21 bis 22). Erst etwa 12 Stunden nach dem Abstreifen der Exuvie beginnt die Anlagerung der Endokutikula, die nach meinen Beobachtungen zunächst sehr langsam vor sich geht. Die im Lichtmikroskop zur Zeit der Häutung kaum zu erkennende äußere Exokutikula absorbiert aber U-V-Licht verschiedener Wellenlängen sehr stark (Tafel 21). Dagegen absorbiert die innere Exokutikula die U-V-Strahlen verschiedener Bereiche gleichmäßig. Dieses Verhalten steht im Gegensatz zu der unterschiedlichen Absorption bei der fertig ausgebildeten inneren Exokutikula der ausgewachsenen Tiere (Tafel 8 und 8a). Daraus ergibt sich, daß die Proteine schon bei der Häutung in der äußeren Exokutikula irgendwie verändert vorliegen und später auch in der inneren Exokutikula eine Umwandlung erfahren, die zeitlich mit dem Härtungs- und Dunklungsprozeß zusammenfällt. Da die Porenkanäle in der fertig ausgebildeten Kutikula deutlicher hervortreten, nehme ich an, daß besonders die in ihnen enthaltenen Proteine, in die außerdem eine Chitinfibrille eingelagert wird, eine Veränderung ihrer Zusammensetzung erfahren. Diese beruht vermutlich auf den Stoffen, die zur Härtung und Dunkelung der äußeren Exokutikula durch die Porenkanäle transportiert werden, also den Phenolen und Aminosäuren. Auffällig ist auch die waagerechte Struktur der inneren Exokutikula, die später durch die Porenkanäle völlig überdeckt und erst nach Verdauung der Proteine mit Pepsin wieder sichtbar wird. Im Gegensatz dazu werden in der frischen Kutikula durch fermentativen Abbau der Proteine die Lamellen zerstört und die Porenkanäle bleiben erhalten (Tafel 22). Weiterhin ist aus den Aufnahmen der Tafel 22 klar ersichtlich, daß

die Epikutikula aus zwei Schichten besteht. Die durch Färbungen nachgewiesene innere proteinreiche Schicht wird durch Pepsin fast völlig verdaut. In der äußeren Exokutikula ist die Umwandlung der Proteine zu „Sklerotin“ noch unvollständig, so daß sie zwar durch Pepsin angegriffen, aber nicht mehr ganz abgebaut werden können. Dadurch werden auch die Porenkanäle in dieser Schicht sichtbar. Dagegen ist der innere Teil der Kutikula noch nicht gefestigt und wird völlig von Pepsin verdaut. Zusätzliche Behandlung mit Chloroform verändert die Struktur nicht merklich.

Vor dem Abwerfen der Exuvie ist die äußere Exokutikula noch durchlässiger für U-V-Licht, und es ist daher möglich, durch diese Schicht hindurch Flächenaufnahmen anzufertigen. Die etwa zwei Stunden vor der Häutung präparierte Kutikula läßt eine deutliche Fibrillenstruktur der Lamellen erkennen (Tafel 23). Die Fibrillen sind aber noch nicht so streng gerichtet wie bei der ausgewachsenen Küchenschabe. Nach der Verdauung mit Pepsin sind sie nicht mehr oder nur noch andeutungsweise vorhanden (Tafel 24). Es ist daher anzunehmen, daß sie noch kein Chitin enthalten oder aber, daß die Chitinmoleküle bzw. Chitinkristallite noch nicht zu langen Ketten zusammengetreten sind. Die Fibrillen werden also zunächst als Eiweißfibrillen angelegt. Ob die auf Tafel 24 (oben) sichtbaren Pünktchen als Porenkanäle angesprochen werden können, ist nicht mit Sicherheit festzustellen. Die Anzahl der Porenkanäle würde dann in diesem Stadium der Kutikulabildung 3 000 000/mm² erreichen!

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die frisch gebildete Kutikula noch keine Chitinfibrillen enthält, da Chitin von Pepsin nicht angegriffen wird. Das in Bildung begriffene Exoskelett der Insekten besteht demnach in erster Linie aus Proteinen. Auch *Richards* (1947) zeigt bei einer Chitinuntersuchung an Schmetterlingen, daß bei der Neubildung der Kutikula zuerst eine Proteinplatte vorhanden ist, an oder in die das Chitin später eingelagert wird.

9. Der Nachweis des Chitins mit Röntgenstrahlen

Die chemischen Nachweisreaktionen für Chitin haben schon zu den verschiedensten Ergebnissen geführt. So hat *Krawkow* (1893) auf Grund seiner Ergebnisse mit Jodreaktionen angenommen, daß es mehrere Chitine gibt. Die von ihm und *Zander* (1897) erhaltenen Farbabstufungen sind nach *Koch* (1932) ein Ausdruck für den unterschiedlichen Abbau des Chitins und der Inkrusten. Obwohl einige Forscher gute Ergebnisse mit chemischen Nachweisreaktionen für Chitin erzielten, ist ihr Wert auch heute noch umstritten, und es haftet ihnen außerdem der Nachteil an, daß sie keine sicheren Rückschlüsse über den Reinheitsgrad des Chitins zulassen.

Zum Nachweis des Chitins in Querschnitten und Flächenpräparaten verwendete ich zunächst versuchsweise folgende Methoden:

1. die erweiterte *Wisselingh*-Methode,
2. die Diaphanol-Chlorzinkjod-Probe nach *Schulze* sowie
3. den Chitinnachweis nach *Glick* (1949).

Die mit diesen Verfahren erzielten Ergebnisse waren aber so unterschiedlich, daß ich nach einem zuverlässigeren Verfahren suchte.

Unter der Voraussetzung, daß das Chitin in genügend hohem Reinheitsgrad vorliegt, bietet das Röntgendiagramm den sichersten Weg zum Nachweis von Chitin und anderen kristallinen Substanzen, sofern ihre Kristallstrukturen bekannt sind. Das Kristallgitter des Chitins wurde von *Gonell* (1926), *Meyer*

und Mark (1928) und Meyer und Pankow (1935) mit Hilfe der Röntgenstrahlen genau untersucht und geklärt. Danach besitzt das Chitin im wesentlichen den gleichen Aufbau wie die Zellulose. Von Meyer und Pankow (1935) wurde festgestellt, daß das Chitin rhombisch kristallisiert, und zwar mit den Kantenlängen:

$$a = 9,40 \text{ \AA}$$

$$b = 10,46 \text{ \AA}$$

$$c = 19,25 \text{ \AA}$$

Die Endokutikula von *Periplaneta americana* wurde nach Vorbehandlung mit Chloroform und Pepsin (genau so waren auch die in den Aufnahmen der Tafeln 13 und 24 wiedergegebenen Häutchen behandelt) in etwa 1 mm breite Streifen geschnitten, von denen 20 bis 30 parallel übereinander gelegt wurden. Die mit Chromstrahlung (Wellenlänge $\lambda = 2,285 \text{ \AA}$) hergestellten Aufnahmen (Tafel 14) ergaben ein klares Chitindiagramm. Die nachstehende Tabelle gibt eine Zusammenstellung der aus dem Röntgendiagramm ermittelten $\sin^2 \vartheta$ -Werte und der aus der Literatur nach der Formel:

$$\frac{4 \sin^2 \vartheta}{\lambda^2} = \frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2}$$

$$\sin^2 \vartheta = 0,01477 \times h^2 + 0,01193 \times k^2 + 0,003522 \times l^2$$

errechneten Zahlen.

$\sin^2 \vartheta$ (gemessen)	$\sin^2 \vartheta$ (nach Angaben der Literatur berechnet)	Indices		
		h	k	l
0,01401	0,014088	0	0	2
0,01411	0,01477	1	0	0
0,04679	0,04772	0	2	0
0,05076	0,05124	0	2	1
0,05899	0,05908	2	0	0
0,06879	0,06828	0	1	4
0,07942	0,07942	0	2	3
0,09070	0,09078	2	0	3
0,10240	0,10407	0	2	4
0,11062	0,11089	0	3	1
0,13609	0,13850	2	2	3
0,16455	0,16372	0	3	4
0,19205	0,19088	0	4	0
0,23996	0,23984	4	0	1
0,27588	0,27200	3	3	3
0,33315	0,33790	3	4	1
0,35963	0,35778	4	3	2

Die Übereinstimmung der aus der Literatur errechneten Werte mit den aus dem Röntgendiagramm der Endokutikula von *Periplaneta americana* ermittelten beweist, daß die Fibrillenstruktur der Lamellen (Tafel 13) aus Chitin besteht. Um ganz sicher zu sein, wurden zum Vergleich Sehnen von Hummer

präpariert und röntgenographisch untersucht (Tafel 15). Während die Kutikula ein *Debye-Scherrer* Diagramm ergibt, ist das Chitin der Sehnen gut orientiert. Die Diagramme zeigen die gleichen Interferenzen, und die ermittelten Werte stimmen gut überein.

Die Klarheit der Interferenzen (Tafel 14) spricht für einen Reinheitsgrad des Chitins von über 95 %. Dagegen kommen bei unbehandelten Häutchen nur die stärksten Interferenzen des Chitindiagramms durch. Bei dem geringen Chitingehalt der Kutikula von *Periplaneta americana* ist aus diesen Diagrammen zu entnehmen, daß die Chitinkristallite gut ausgebildet und zu größeren Verbänden (Fibrillen) zusammengeschlossen sein müssen.

Röntgendiagramme der unbehandelten, frisch gehäuteten Kutikula von *Periplaneta americana* geben nur die stärksten Linien des Chitins wieder, da die schwächeren Linien des Chitindiagramms durch Proteine überdeckt werden (Tafel 16 oben). Nach Chloroformextraktion und Pepsinverdauung erhält man dagegen ein Chitindiagramm (Tafel 16 unten), das alle charakteristischen Linien gut erkennen läßt. Damit ist bewiesen, daß auch in der frisch gehäuteten Kutikula bereits Chitin-Kristallite vorhanden sind. *Trim* (1941) hat schon angedeutet, daß möglicherweise kristallisiertes Chitin in Verbindung mit einem Protein-Komplex von den Epidermiszellen ausgeschieden wird. Die Polymerisation zu langen Chitinfibrillen erfolgt erst zum gleichen Zeitpunkt wie der Härtings- und Dunklungsprozeß der Proteine zu „Sklerotin“, was sich aus einem Vergleich der U-V-Aufnahmen ergibt. In der Larvenkutikula von *Sarcophaga* (*Fraenkel* und *Rudall* 1940) tritt die Orientierung der Chitinkristallite in den Proteinlamellen erst bei der Bildung der Puppenkutikula ein.

Auch von der Endokutikula des Pronotums von *Melolontha vulgaris* wurden in der gleichen Weise mit den beschriebenen Diagrammen übereinstimmende Röntgendiagramme hergestellt. Sie beweisen klar, daß die im U-V-Licht aufgenommenen Fibrillenstrukturen der Lamellen und Balken Chitin enthalten, das nach Entfernung der Lipoide und Proteine in großer Reinheit vorliegt. Infolge der Überkreuzung der Fibrillen bzw. Balken in den einzelnen Lagen kommt aber kein Faserdiagramm zustande, wie es die einheitlich ausgerichteten Chitinkristallite der Sehnen (Tafel 15) ergeben.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse liefern einen Beitrag zur Klärung der Struktur und Zusammensetzung der Insektenkutikula. Mit Hilfe der direkten Gefrierschnittmethode ohne vorherige Fixierung und Einbettung erhielt ich die erforderlichen völlig unveränderten Präparate.

Die zunächst im Lichtmikroskop an gefärbten Schnitten (Tafel 1—7) erzielten Ergebnisse wurden durch Beobachtungen im Polarisations- und Elektronenmikroskop sowie vor allem durch U-V-Aufnahmen (Tafel 8—24) bestätigt und erweitert.

Danach besteht die K u t i k u l a von *Periplaneta americana* aus drei Schichtkomplexen (Abb. 2, Seite 100), deren verschiedene Dicke (Abb. 3—5, Seite 101 und 102) die Beweglichkeit und zugleich Starrheit der Insekten bewirkt.

Die strukturlose E p i k u t i k u l a überzieht den ganzen Insektenkörper und setzt sich bei *Periplaneta americana* aus einer äußeren, aus gerichteten Wachskristalliten bestehenden Wachsschicht und einer inneren Proteinschicht zusammen (Abb. 2, Seite 100).

Kennzeichnend für die darunter liegende Exokutikula sind die Porenkanäle, die für die Neubildung der Kutikula wichtig sind. Sie reichen von der Epikutikula bis hinab in die äußerste Lamelle der Endokutikula und enthalten Proteine, die je eine distale Chitinfibrille umschließen (Abb. 6, Seite 105). Die Anzahl der Porenkanäle pro Flächeneinheit nimmt von außen nach innen ab (Tafel 3—5).

Die Exokutikula besteht aus einem äußeren, harten und dunkel gefärbten Teil und aus einem inneren, der sich von der darunter liegenden Endokutikula durch den Besitz der erwähnten Porenkanäle unterscheidet. Bei *Melolontha vulgaris* und *Rhodnius prolixus* ist diese Unterscheidung der Exokutikula

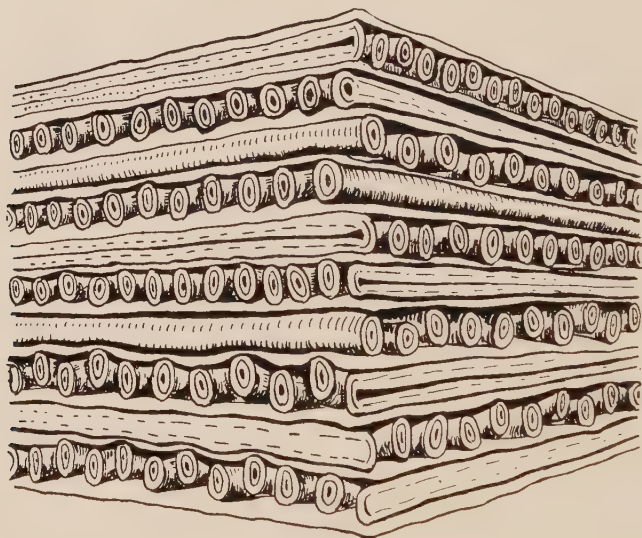


Abb. 7. Schematische Darstellung der fibrillären Lamellen in der Endokutikula von *Periplaneta americana*. Jede Fibrille besteht aus einem Chitinkern, der von einer Lipoproteinhülle umgeben wird, um die herum leicht lösliches Protein gelagert ist.

in zwei Schichten nicht möglich, da sie in ihrer ganzen Dicke dunkel gefärbt ist; sie besitzt aber ebenfalls Porenkanäle.

Die Exo- und Endokutikula der untersuchten Insektenarten besitzt die gleiche Grundstruktur:

Zu langen Micellen zusammengetretene Chitinkristallite werden von einer Lipoproteinhülle umgeben und bilden Fibrillen, die zu Lamellen — bei *Periplaneta americana* (Abb. 7) und in der Puppenkutikula von *Musca domestica* — oder zu Balken — bei *Melolontha vulgaris* und *Rhodnius prolixus* (Abb. 8) — zusammengefaßt sind. Das Lipoprotein läßt sich durch Kombination von Pepsin- und Chloroformbehandlung extrahieren. Dabei wird das den Kern der Fibrille bildende Chitin nicht angegriffen.

Während die zu Balken vereinigten Fibrillen von einer gemeinsamen Proteinhülle umfaßt werden (Abb. 8), ist jede Fibrille der Lamellen (Abb. 7) in

Protein eingehüllt. Zwischen den einzelnen Lamellenlagen befinden sich noch homogene Proteinschichten; sie bewirken die im Querschnittspräparat sichtbare Lamellenstruktur.

Die Balken und die in Lamellen angeordneten Fibrillen überkreuzen sich in den einzelnen Lagen in einem Winkel von etwa 75° . Obwohl die Fibrillen in den Balken bedeutend länger sind als in den Lamellen, besitzen sie in beiden Typen den gleichen Durchmesser (Tafel 11—12, 19—20).

In der frisch gehäuteten Kutikula ist bereits Chitin in kristalliner Form vorhanden, doch sind die Kristallite noch nicht zu Fibrillen zusammengetreten. Die Struktur der Kutikula wird also zuerst von den Proteinen vorgebildet.

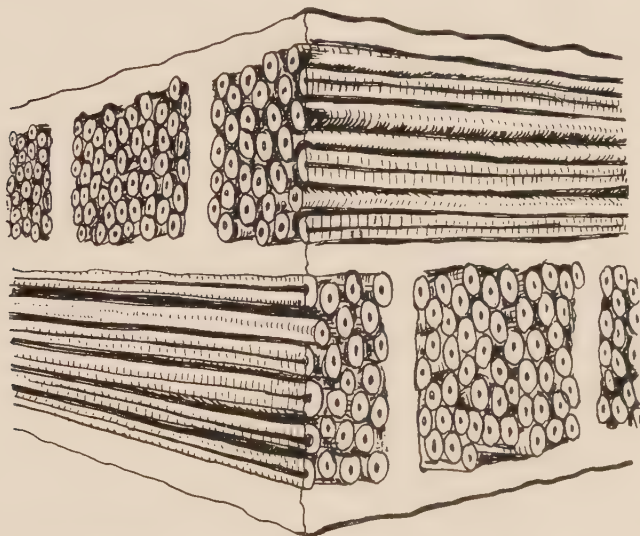


Abb. 8. Schema der die Endokutikula von *Melolontha vulgaris* aufbauenden Balken. Diese setzen sich aus von Lipoprotein umgebenen Chitinfibrillen zusammen und sind von einer gemeinsamen Proteinhülle umgeben.

Die fertige Kutikula von *Periplaneta americana* setzt sich im wesentlichen aus Proteinen, Lipoiden und Chitin zusammen. Während die Proteine prozentual von innen nach außen zunehmen, steigt der Anteil des Chitins von der äußeren zur inneren Schicht an.

Die Lipotide sind in der äußeren Epikutikula (Wachsschicht) angehäuft, aber in Form von Lipoproteinen auch über die ganze Kutikula verteilt.

Die Kutikula von *Periplaneta americana* enthält 37 % Wasser, 44 % Proteine (in löslicher und unlöslicher Form sowie als Sklerotin), 15 % Chitin und 4 % Lipotide.

Der geringe Anteil des Chitins rechtfertigt es nicht, die Insektenkutikula als „Chitinpanzer“ oder auch nur als „Chitin“ zu bezeichnen, zumal Chitin ein chemisch und physikalisch genau definiertes Polysaccharid darstellt.

Die kristalline Struktur des Chitins ermöglicht dessen exakten Nachweis in der Insektenkutikula mit Hilfe von Röntgendiagrammen.

Teil B.

Die Permeabilität der Kutikula von *Periplaneta americana* L.

1. Die Durchlässigkeit der Kutikula für Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur

Der geschilderte Aufbau des Exoskelettes von *Periplaneta americana* spricht für eine sehr geringe Durchlässigkeit der Kutikula für Wasser, für die vor allem die Wachsschicht der Epikutikula verantwortlich ist. Nach Beament (1948) sind auch nur die gerichteten Wachsmoleküle der Epikutikula für den Verdunstungsschutz von Bedeutung. Bei einer für die verschiedenen Arten konstanten „kritischen“ Temperatur verlieren die Wachsmoleküle ihre orientierte Anordnung durch Aufhebung der „van der Waal'schen Kräfte“. Diese kritische Temperatur liegt 5—10° unter dem Schmelzpunkt der Wachse (Wigglesworth 1950). Dadurch steigt die Wasserdurchlässigkeit stark an, und die Insekten trocknen aus, sofern sie nicht in feuchtigkeitsgesättigte Luft gebracht werden.

Die großen Unterschiede in der Austrocknung der einzelnen Insektenarten sind auf die artspezifische Konstitution des Wachses zurückzuführen (Lees 1947). Die kritische Temperatur liegt nach Wigglesworth (1950) zwischen 30° C und 60° C; er gibt im einzelnen die folgenden Werte an:

<i>Periplaneta americana</i>	30° C
<i>Pieris</i> (Larve)	37° C
<i>Tenebrio</i> (Larve)	49° C
<i>Rhodnius prolixus</i>	57° C
<i>Pieris</i> (Puppe)	58° C

Eine beschleunigte Austrocknung der Insekten läßt sich auch durch Abreiben oder Extraktion der Wachsschicht erreichen. Alexander, Kitchener und Briscoe (1944) haben die austrocknende Wirkung von Inert-Staub auf Insekten an einem künstlichen System überprüft, indem Zelluloid-Membranen mit einem extrem dünnen Wachsfilz überzogen wurden. Die Steigerung der Durchlässigkeit der Membranen beruht darauf, daß feinste Löcher in den Wachsfilz gerissen werden.

Richards und Hsing Yan Fau (1949) bestimmten die Durchlässigkeit der Kutikula verschiedener Larven in Diffusionszellen und fanden keinen Zusammenhang zwischen der Permeabilität und der Dicke oder der sichtbaren Struktur der Kutikula. Der starke Wasserverlust der im Boden lebenden Insektenlarven ist durch das Abreiben der Wachsschicht der Epikutikula durch die Bodenteilchen bedingt (Wigglesworth 1950). Werden die Larven außerhalb des Bodens gehalten, so bleibt ihre Kutikula ebenso undurchlässig wie die anderer Insekten.

Obwohl die Durchlässigkeit der Insektenkutikula schon mehrfach untersucht wurde, liegen bisher keine vergleichbaren Ergebnisse vor, da die Versuche auf ganz verschiedene Weise und mit verschiedenen Objekten durchgeführt wurden. Die von mir angewandte neue Methode gestattete die Durchlässigkeitsbestimmungen an der unversehrten Kutikula:

Methode:

Dorsale und ventrale Abdominalsegmente sowie Intersegmentalhäute von *Periplaneta americana* wurden vorsichtig und ohne Beschädigung der Epikutikula von den Epidermiszellen gelöst. Der mittlere Teil eines Segmentes wurde

dann zwischen zwei Gummiplatten über eine Bohrung von 2 mm Durchmesser gespannt (Abb. 9) und auf völlige Homogenität überprüft. Da nämlich die Durchlässigkeit der normalen Kutikula ermittelt werden sollte, durften keine Haare, Sinnesorgane oder Stigmen über die Bohrung gelangen.

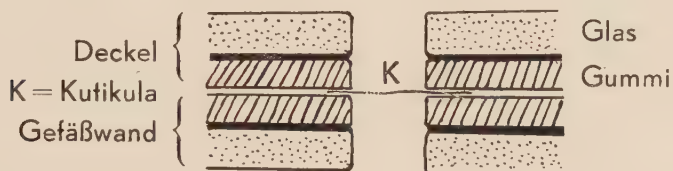


Abb. 9. Schema zur Befestigung der Kutikula an den Glasgeräten für die Durchlässigkeitsbestimmungen.

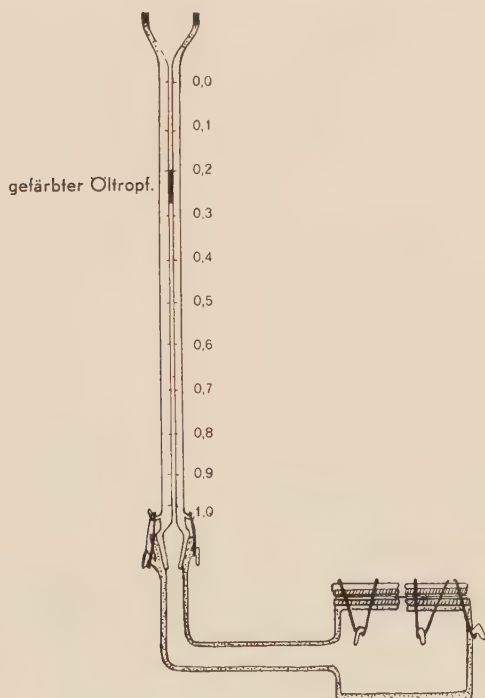


Abb. 10. Apparatur zur Bestimmung der Durchlässigkeit von Kutikulastücken für Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur.

Das Meßgefäß (Abb. 10) gestattete eine Ablesegenauigkeit von $\frac{1}{100}$ ccm. Um eine Verdunstung der Wassersäule zu verhindern, wurde sie in der Mikrobürette mit einem gefärbten Öltropfen überschichtet, der zugleich das Ablesen sehr erleichterte. Der durch die Wassersäule entstehende geringe Überdruck wirkte sich auf die Durchlässigkeit der Kutikula nicht meßbar aus.

Durch Anlegen eines geringen Überdruckes wurde nun die eingespannte Kutikula auf ihre Dichte geprüft und in einen Thermostaten gestellt, in dem das Meßgefäß bei der gewünschten Temperatur 10 Tage verblieb. In dem Thermostaten wurde durch die von Janisch (1933) angegebenen Salzbreie eine relative Luftfeuchtigkeit von 20—25 % konstant gehalten.

Ergebnis:

Zwischen dorsalen und ventralen Segmenten konnte an dem hier verwendeten toten Material kein Unterschied in der Durchlässigkeit festgestellt

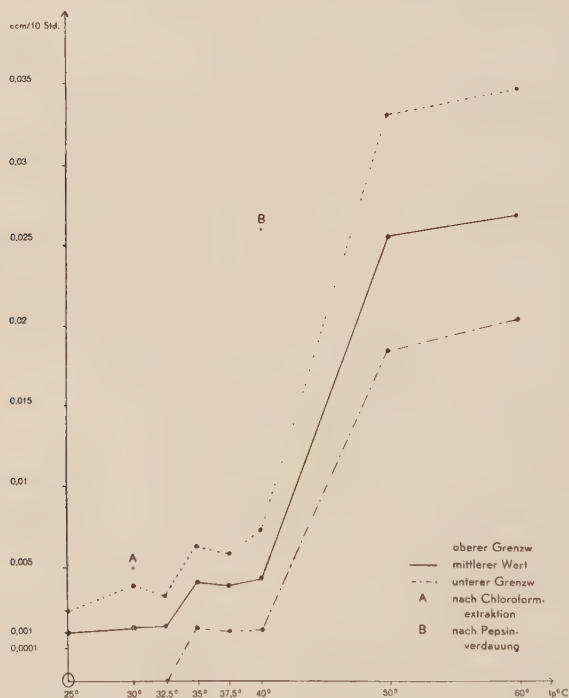


Abb. 11. Die Durchlässigkeit des dritten Abdominaltergits von *Periplaneta americana* für Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur.

werden; auch die Intersegmentalhäute zeigten bei niedrigen Temperaturen die gleiche Permeabilität. Bei höheren Temperaturen rissen sie aber nach wenigen Stunden ein, so daß von 35° C aufwärts keine Messungen mehr möglich waren. Für jede Temperaturstufe wurden 12—15 Messungen durchgeführt. Die nach 10 und mehr Tagen abgelesenen Werte wurden auf 10 Stunden berechnet und sind in der untenstehenden Kurve (Abb. 11) für das dritte Abdominaltergit von *Periplaneta americana* wiedergegeben.

Die Durchlässigkeitskurve (Abb. 11) verzeichnet zwischen 32° und 35° C und zwischen 40° und 50° C jeweils einen steilen Anstieg. Zwischen 32,5° C und 35° C verlieren die Wachsmoleküle der Epikutikula ihre orientierte Anordnung und werden dadurch für Wasser durchlässig. Zur Bestätigung dieser Annahme

wurde die Durchlässigkeit mit Chloroform extrahierter Segmente bei 30° C gemessen. Der in Punkt A wiedergegebene Wert liegt etwa ebenso hoch wie die Durchlässigkeit der unbehandelten Kutikula bei 35° C und liefert so den Beweis, daß eine Veränderung der Lipoidschicht für diesen Anstieg der Durchlässigkeit (bei 32,5—35° C) verantwortlich ist. Mit Pepsin verdaute Segmente zeigen andererseits, daß der zweite Anstieg der Kurve auf einer Veränderung der Proteine beruht (Punkt B).

Eine genaue Bestimmung der kritischen Temperatur der Kutikula von *Periplaneta americana* war mir nicht möglich, da die Temperatur in dem zur Verfügung stehenden Thermostaten zu stark schwankte. Der zwischen 32,5° C und 35° C liegende Wert ist etwas höher als der von Wigglesworth (1950) angegebene.

Diese Ergebnisse bestätigen somit, daß die Durchlässigkeit der Insektenkutikula für Wasser nicht von ihrer Dicke abhängt, aber sehr stark von der Temperatur beeinflußt wird. Die Wachsschicht garantiert bei niederen Temperaturen einen wirksamen Verdunstungsschutz, doch wird die Undurchlässigkeit der Kutikula in erster Linie von den Proteinen gewährleistet.

2. Die Durchlässigkeit der Kutikula für E 605

Das 1944 von den Farbenfabriken Bayer entwickelte Kontaktinsektizid E 605 ist ein Diäthyl-p-nitro-phenyl-thiophosphat, dem ein bestimmter Emulgator im Verhältnis 1:1 zugesetzt ist. Bei bestimmten Handelspräparaten wird eine Mischung mit dem Dimethylester im Verhältnis 1:4 bevorzugt, weshalb auch diese in die Untersuchungen mit einbezogen wurde.

E 605 wirkt als neurotropes Kontaktinsektizid, dem aber auch Fraß- und Atemgiftwirkung zukommt. Mich interessierte nun die Frage, ob das E 605 bzw. eine seiner Komponenten in der Lage ist, die Insektenkutikula an Stellen zu durchdringen, die keine natürlichen Öffnungen (Stigmen, Sinnesorgane, Haare etc.) besitzen.

Methode:

Dorsale und ventrale Abdominalsegmente von *Periplaneta americana* wurden in der im vorigen Kapitel beschriebenen Art in einen Rahmen eingespannt. Das Glasgefäß für diese Durchlässigkeitsmessungen ist in Abb. 12 wiedergegeben. Das innere Gefäß wurde mit 3 ccm dest. Wassers beschickt und in das äußere Becherglas so hoch E 605-Emulsion eingefüllt, daß beide Flüssigkeitsspiegel auf gleichem Niveau standen. Eine Nebenwirkung durch Druckunterschiede war dadurch ausgeschlossen. Im Falle einer Durchlässigkeit der Kutikula für E 605 mußte der Wirkstoff in dem Wasser des inneren Glasgefäßes in Lösung gehen und damit nachweisbar sein. E 605 löst sich bei Zimmertemperatur in Wasser im Verhältnis 1:20 000 (Frohberger 1949) und ist im biologischen Test in einer Verdünnung von 1:10 Millionen noch nachweisbar. Zum Austesten des Wassers benutzte ich die besonders empfindlichen Larven von *Aedes ägypti*, nachdem die Kutikula bei Zimmertemperatur 10 Tage lang der E 605-Emulsion ausgesetzt worden war. Die Larven waren 7 Tage alt.

Versuchsreihen:

Zunächst wurden an dorsalen Abdominalsegmenten von *Periplaneta americana* 0,1%ige Emulsionen der Aethyl- und Methylverbindungen sowie die im Handel befindliche Mischung in Verbindung mit dem Emulgator getestet,

doch konnte der Wirkstoff in keinem Fall in dem inneren Glasgefäß nachgewiesen werden. Wurde dagegen eine Kutikulastelle, die Haare, Borsten oder Stigmen enthielt, über der Bohrung eingespannt, so trat schon nach wenigen Minuten eine 100%ige Abtötung der Testtiere ein. Ein Durchlässigkeitsunterschied zwischen dorsalen und ventralen Abdominalsegmenten konnte weder bei männlichen noch bei weiblichen Tieren festgestellt werden. Auch die Intersegmentalhäute zeigten nach 5tägiger Einwirkungsdauer noch keine biologisch nachweisbare Durchlässigkeit.

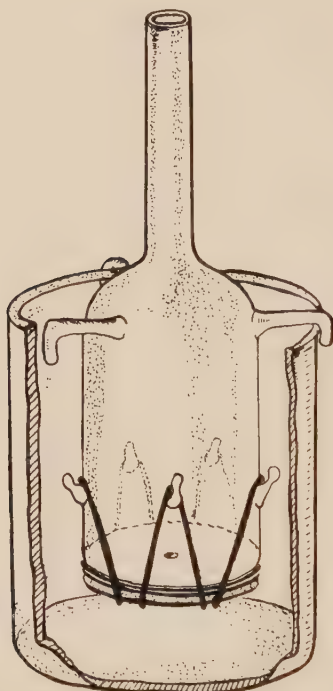


Abb. 12. Glasgerät für Durchlässigkeitsprüfung der Kutikula für E 605.

Auch nach Chloroformextraktion der Kutikula ließ sich bei *Tergiten* kein Wirkstoff im Wasser des inneren Gefäßes durch den Mücken-Larven-Test nachweisen. Wurden dagegen die dünneren Sternite von *Periplaneta americana* nach der Extraktion verwendet, so trat nach etwa 8 Stunden eine 100%ige Abtötung der Mückenlarven ein. Aethyl- und Methylwirkstoff sowie ihre Mischung verhielten sich gleich.

Durch Pepsinverdauung stieg die Durchlässigkeit der Kutikula für E 605 an. Bei *Tergiten* wurden die Mückenlarven durch den Aethylester nach 6 Stunden alle abgetötet, während bei Sterniten schon nach 4 Stunden 100%ige Abtötung eintrat. Der Methylwirkstoff durchdringt die verdaute Kutikula etwas besser.

Ergebnis:

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die Kutikula von *Periplaneta americana* für E 605 undurchlässig ist, sofern sie keine natürlichen Öffnungen, wie Sinnesorgane, Stigmen, Haare etc., enthält. Wie bei der Durchlässigkeit für Wasser steigt auch die Durchlässigkeit für E 605 nach Verdauung der Proteine stärker an als nach der Extraktion der Fette. Die vielfach aufgestellte These, daß die Kontaktinsektizide durch ihre hohe Lipoidlöslichkeit die Kutikula durchdringen, kann ich somit nicht bestätigen. Wohl aber kann auf diesem Wege eine Durchdringung der Epikutikula erfolgen. So können die Kontaktinsektizide in die Haarkanäle und Sinnesorgane eindringen, die nur durch die Epikutikula geschützt sind.

Tabelle zur Durchlässigkeit der Kutikula
von *Periplaneta americana* für E 605

Die Abtötungszeit in Stunden bezieht sich auf 7 Tage alte Larven
von *Aedes ägypti*

Vorbehandlung der Kutikula	Aethylester		Methylester		Mischung 1:4	
	Tergit	Sternit	Tergit	Sternit	Tergit	Sternit
Abtötungszeit in Stunden						
Unbehandelt	—	—	—	—	—	—
Chloroform	—	8	—	8	—	8
Pepsin	6	4	5,5	3,5	5,5	3,5

3. Die Prüfung der E 605-Durchlässigkeit am lebenden Objekt

Versuchsanordnung:

Die geschilderten Ergebnisse bedurften der Bestätigung am lebenden Objekt. Imagines von *Periplaneta americana* wurden durch starke Abkühlung in Kältestarre versetzt und beim Erwachen in folgende Versuchsanordnung gebracht:

- a) Auf dem Boden einer Glasschale wurde ein kleiner Tropfen Aethylwirkstoff verrieben und mit 6 Tieren besetzt.
- b) 6 Tiere wurden am Pronotum mit einem kleinen Tropfen des Wirkstoffes betupft und dann in kleine geschlossene Glasgefäße gebracht, deren Durchmesser der Länge der Tiere entsprach. Die Größe der Gefäße ließ den Tieren nur eine ganz geringe Bewegungsfreiheit und erschwerte ein Abputzen des Giftes.
- c) In gleich großen Glasringen, die oben und unten mit Drahtnetz abgeschlossen waren, wurden 6 Tiere einem kontinuierlichen E 605-Gasstrom ausgesetzt (Abb. 13).
- d) 6 auf dem Pronotum betupfte Tiere wurden in den gleichen Käfigen in einen durch Ventilator erzeugten Luftstrom gestellt, der das verdampfte E 605 aus der Umgebung der Tiere nach oben wegführte.

Während bei den Versuchen a) und c) keine Fehler auftreten können, läßt sich bei den betupften Tieren, b) und d), ein Abstreifen des Wirkstoffes an der Glaswand nicht völlig verhindern. So kommt das Insekt auch an anderen

Körperstellen — vor allem den Tarsen und Fühlern — mit dem Gift in Berührung. Dennoch bevorzugte ich diese Anordnung, weil sie eine etwa eintretende Giftwirkung deutlich erkennen läßt und die Tiere bei der Versuchsanstellung nicht beschädigt werden. Bei der Methode von O'Kane und Glover (1935), die kleine auf den Thorax gebrachte Wachszellen verwendeten, ist eine Verletzung der Kutikula nicht zu verhindern, weil die Wachsschicht von *Periplaneta americana* sehr weich ist. Auch durch Aufkleben der Tiere mit Wachs oder ähnlichen Stoffen wird die Kutikula leicht beschädigt, und die Vergiftungssymptome (Erregungsstadien) sind infolge der Bewegungsunfähigkeit nicht zu erkennen.

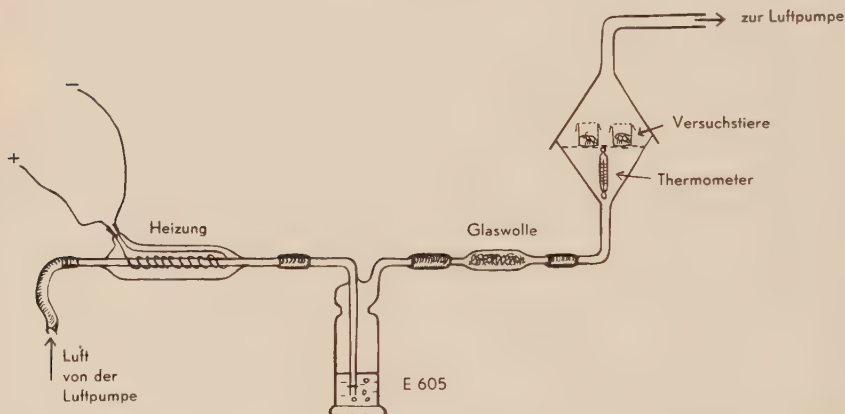


Abb. 13. Versuchsanordnung zur Prüfung der Dampfwirkung von E 605 auf *Periplaneta americana*.

Der Versuch galt als beendet, wenn alle im Versuch stehenden Küchenschaben sich innerhalb von drei Stunden nicht mehr aus der Rückenlage erholten.

Ergebnis:

Die dreimalige Wiederholung der Versuchsreihe mit je 6 Imagines von *Periplaneta americana* ergab die in der Tabelle angegebenen mittleren Abtötungszeiten bei Verwendung von Diäthyl-p-nitro-phenyl-thiophosphat.

Versuchsanordnung	Rückenlage nach Stunden
a (Boden einer Glasschale)	2,75
b (Betupft im geschlossenen Gefäß)	8,04
c (Im Gasstrom)	7,9
d (Betupft im Luftstrom)	15,25

Die gleichen Versuche wurden mit dem Dimethyl-p-nitro-phenyl-thiophosphat, dem Dichlor-diphenyl-trichloräthan (DDT) und dem Hexachlor-cyclohexan durchgeführt. Die Ergebnisse gleichen im wesentlichen dem aus der Tabelle ersichtlichen Verhältnis:

$$a : b : c : d = 1 : 3 : 3 : 6.$$

Die Abtötungszeiten (s. Tab.) zeigen deutlich, daß die Versuchstiere bei Berührung des Giftes mit den Tarsen sehr schnell sterben (a). Wird der Wirkstoff dagegen auf die homogene Kutikula des Pronotums gebracht, so tritt eine Wirkung erst ein, wenn auch die reine Dampfphase zur Abtötung führt (b und c). Daraus ergibt sich, daß in kleinen geschlossenen Glasgefäßen sehr schnell eine Giftatmosphäre entsteht, die über die Atmungsorgane auf das Insekt wirkt. Die auch bei den betupften Tieren im Luftstrom (d) eintretende Wirkung kommt daher, daß ein Verschmieren des Wirkstoffes an den Glaswänden auf die Dauer nicht verhindert werden kann, und dadurch das Insekt mit den Tarsen und Fühlern das Gift berührt. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß in der Versuchsreihe der reine Wirkstoff benutzt wurde, während in der Praxis nur eine 0,02%ige Emulsion zur Anwendung gelangt.

Die Ergebnisse an lebenden Küchenschaben bestätigen somit die Befunde des vorigen Kapitels. Sie zeigen deutlich, daß E 605 und die anderen geprüften Kontaktinsektizide die homogene Kutikula nicht zu durchdringen vermögen, sondern auf praeformierte Stellen wie Haare und Sinnesorgane als Eintrittspforten angewiesen sind.

4. Injektion von E 605

Da die homogene Kutikula von *Periplaneta americana* für E 605 nicht durchlässig ist, war nun noch zu prüfen, ob die Wirksamkeit des E 605 an die Sinnesorgane der Tarsen und Fühler gebunden ist, oder ob es unter der Vor-

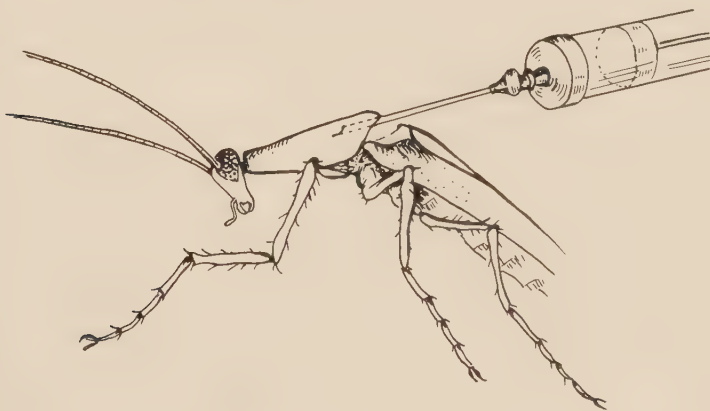


Abb. 14. Injektion von E 605 unter den Halsschild von *Periplaneta americana*.

aussetzung einer Eindringungsmöglichkeit an jeder beliebigen Körperstelle zur Wirkung gelangen kann. Diese Frage sollte durch Injektion von Diäthyl-p-nitro-phenyl-thiophosphat in die verschiedenen Körperteile geklärt und gleichzeitig die Dosis letalis für *Periplaneta americana* ermittelt werden.

Injiziert wurde $\frac{1}{100}$ ccm einer Emulsion von gleichen Teilen Diäthylester und Emulgator in Wasser. Bei einem abgestuften Wirkstoffgehalt von 0,01—0,1 % erhielt ein Tier 1—10 γ Gift. Den Kontrolltieren wurde die gleiche Menge einer physiologischen Kochsalzlösung eingespritzt. Infolge der Härte der Kutikula mußte die Nadel durch die Intersegmentalhäute eingeführt werden, wie es in Abb. 14 bei Applikation des Giftes unter den Halsschild dargestellt ist. (Auf

die Oberseite des Halsschildes wurde in der vorigen Versuchsreihe der reine Wirkstoff getupft.) In gleicher Weise wurde das Gift an mehreren Stellen des Abdomens injiziert. Die an der Einstichstelle austretende Körperflüssigkeit wurde jeweils abgetupft und die Emulsion erst einige Sekunden später injiziert, um eine Kontrolle zu haben, ob der Wirkstoff auch im Insektenkörper verblieb.

Bei diesen Versuchen ergab sich zunächst, daß die tödliche Menge des Diäthylesters bei 1–2 γ pro Tier liegt, ganz unabhängig von der jeweiligen Injektionsstelle. Aus dem durchschnittlichen Lebendgewicht der Versuchstiere von 850 mg und der eingespritzten Giftmenge wurde die mittlere letale Dosis mit 1,8 mg pro kg Körpergewicht errechnet.

Die Dosis letalis des Diäthyl-p-nitro-phenyl-thiophosphats liegt somit für *Periplaneta americana* bedeutend tiefer als die in der Literatur für Warmblüter angegebenen Werte. Die mittlere Dosis letalis beträgt nämlich nach Hecht und Wirth (1950) beim Frosch (in den Lymphsack injiziert) 200 mg/kg, bei der weißen Maus (subkutan) 10–12,5 mg/kg, beim Kaninchen (subkutan) 40 mg/kg und bei der Katze 15 mg/kg.

Die Unabhängigkeit der Wirkung von der Injektionsstelle zeigt, daß E 605 an jeder beliebigen Körperstelle zur Wirkung gelangen kann, sofern die Kutikula die für ihre Durchdringung erforderlichen Eintrittspforten besitzt.

5. Zusammenfassung und Besprechung der Ergebnisse¹

Der Eindringungsmechanismus von Kontaktinsektiziden in den Insektenkörper ist in den letzten Jahren vor allem für DDT und seine Derivate vielfach untersucht worden. Auf Grund der Lipoidlöslichkeit des DDT schreibt Domenjoz (1944): „Ihre Diffusion in den Insektenkörper scheint dagegen“ (im Vergleich zur Haut der Säuger) „durch die Chitinhülle und durch die in dieser Hülle ein- und aufgelagerten Lipoiden besonders begünstigt zu sein. Um einen klassischen Vergleich zu gebrauchen, sind es die lipoiden Substanzen der Insektenkutikula, auf denen wie auf einer Gleitschiene die Kontaktgifte an ihren Wirkungsort gelangen.“ Dagegen kam Lietz (1942) zu dem Schluß, daß die Vorstellung der Lipoidgleitschiene trotz der hohen Lipoidlöslichkeit des DDT nicht zutreffend ist.

Die Durchlässigkeitsversuche mit E 605 an der extrahierten Kutikula bestätigen die letztgenannte Auffassung und zeigen, daß die Lipoiden nicht die Bedeutung haben, die ihnen als „Gleitschiene“ für lipoidlösliche Kontaktinsektizide zugesprochen wird. Der beschriebene Chitin-Lipoprotein-Protein-Komplex ist zu kompakt, als daß die Lipoiden noch als Lösungsmittel für die Kontaktinsektizide dienen könnten. Sie sind außerdem in Protein eingebettet, so daß eine Diffusion durch die Kutikula auf diesem Wege nicht gut vorstellbar ist. Dagegen stellen die Lipoiden der Wachsschicht der Epikutikula einen wirksamen Verdunstungsschutz dar und bedingen bei normalen Temperaturen in Verbindung mit den Proteinen die Wasserundurchlässigkeit der Kutikula (Abb. 11).

Roy und Gosh (1944) nahmen an, daß die Kontaktinsektizide durch die Tracheen in den Insektenkörper gelangen und nicht durch die Kutikula. Nach den Untersuchungen von Krüger (1931) über die Wirkungsweise von dalmatinischem Insektenpulver ist eine Wirkung über die Tracheen nicht wahrscheinlich, sondern die dünnen Teile der Insektenhaut stellen die Eintrittspforten für den Giftstoff dar.

¹ Eine Zusammenfassung der Untersuchungen über den Aufbau der Kutikula von *Periplaneta americana* befindet sich am Ende des ersten Teiles der Arbeit auf Seite 117.

Die Atemgiftwirkung von E 605 ist, wie die vergleichenden Versuchsreihen zeigten, recht beachtlich; besonders, wenn man bedenkt, daß die Atmungsintensität durch die erzwungene Ruhe der Tiere herabgesetzt war. Dennoch dringt der Giftstoff schneller durch die Tarsen in den Insektenkörper. Die tödliche Lähmung der Insekten tritt nach Potts und Vanderplank (1945) um so schneller ein, je besser die Sinnesorgane entwickelt sind. Auch bei Federlingen und Vogelmilben dienen nach Schmid (1949) die Tastorgane der Gliedmaßen als Eintrittsstellen für Kontaktinsektizide. Wegen ihres hohen Lipoidgehaltes hält Wiesmann (1947) die Sinnesorgane und Intersegmentalhäute für die prae-disponierten Eintritts- bzw. Resorptionsstellen des auf sie gelangenden DDT, und er schreibt (1949): „... daß die Eintrittspforten der Wirksubstanz die Sinnesorgane darstellen, während an den sinnesorganfreien, sklerotierten Cuticula-partien keine Permeabilität vorhanden ist.“ Ein Eindringen von DDT und Hexachlorcyclohexan in den Insektenkörper ist nach Witt (1947) durch die dicken Chitinplatten des Exoskelettes unmöglich, erfolgt vielmehr durch die Gelenkspalten, Sinnesorgane und Stigmen.

Meine mit E 605 erhaltenen Befunde stimmen mit den angeführten Ergebnissen anderer Autoren gut überein: E 605 kann, wie auch andere Kontaktinsektizide, die homogene Kutikula nicht durchdringen. Es dringt vielmehr an den von der Natur zur Aufnahme von chemischen und physikalischen Reizen bestimmten Stellen, den Sinnesorganen, sowie durch die Stigmen und Haarwurzeln in den Insektenkörper ein und gelangt so an den Ort seiner Wirksamkeit.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1949—1952 auf dem Obst- und Versuchsgut Höfchen der Farbenfabriken „Bayer“, Leverkusen, durchgeführt.

Literaturverzeichnis

Die mit einem * versehenen Arbeiten waren mir nur im Referat zugänglich.

- Alexander, Kitchener und Briscoe, 1944:
The Effect of Waxes and inorganic Powders on the Transpiration of Water through Celluloid Membranes. — Trans. Faraday Soc. 40; 10.
- 1944:
Inert Dust Insecticides. — Ann. appl. Biol. 31, 143—159.
- * Alexandrov, 1935 (russisch):
Die Permeabilität des Chitins einiger Dipteren-Larven und eine Methode für Permeabilitätsforschung. — Ber. wiss. Biol. 33, 263.
- Anderson und Richards, 1942:
Nature through the Electron Microscope. — The Scientific Monthly, 50, 187—192.
- Armstrong, Bradbury und Standen, 1951:
Penetration of the Insect Cuticle by Isomers of Benzene Hexachloride. — Nature 167, 319.
- Bamann und Myrbäck, 1941:
Die Methoden der Fermentforschung. — Georg Thieme, Leipzig.
- * Beament, 1945:
The Cuticular Lipoids of Insects. — J. exp. Biol. 21, 115—131.
- 1946:
The Waterproofing Process in Eggs of *Rhodnius prolixus* Stühl. Proc. roy. Soc. 133, 407—418.
- 1948:
The Penetration of the Insect Egg-Shells I. — Bull. Ent. Res. 39, 359—385.
- The Role of Wax Layers in the Waterproofing of Insect Cuticle and Egg-Shell. — Dis. Faraday Soc. No. 3, 117—182.
- 1949:
The Penetration of Insect Egg-Shell II. — Bull. Ent. Res. 39, 467—488.

- Biedermann, 1902:**
Über die Struktur des Chitins bei Insekten und Crustaceen. — Anat. Anz. 21, 485—490.
- 1903:
Geformte Sekrete. — Ztschr. allg. Physiol. 2, 395—481.
- Bott, 1948:**
Der Einfluß des Kontaktstoffes Gix auf den Körper der Schädlinge. — Anz. Schädlingskunde 21, 91—95.
- Bredenkamp, 1941:**
Zur Kenntnis der Wirkungsweise der Kontaktgifte mit besonderer Berücksichtigung der Permeabilität der Insektenkutikula. — Ztschr. angew. Ent. 28, 519.
- Buchmann, 1939:**
Versuche zur quantitativen Wertbestimmung von Pyrethrum-Insektenpulvern durch den physiologischen Tierversuch. — Ztschr. Desinfektion und Gesundheitswesen 22, 414—418.
- Buck und Keister, 1949:**
Respiration and Waterloss in the Adult Blowfly, *Phormia regia*, and their Relation to the physiological Action of DDT. — Biol. Bull. 97, 64—81.
- * Bütschli, 1894:**
Vorläufige Mitteilung über fortgesetzte Untersuchungen an Gerinnungsschäumen, Sphärokristallen und die Struktur von Zellulose und Chitinmembranen. — Verh. Naturforsch. Ges. Heidelberg 5, 230—292.
- Claudsley-Thompson, 1950:**
Epicuticle of Arthropods. — Nature 165, 692—693.
- Danneel, 1946:**
Melaninbildende Fermente bei *Drosophila melanogaster*. — Biol. Zentr. Bl. 65, 115—119.
- Dennell, 1945:**
Insect Epicuticle. — Nature 155, 545.
- 1946:
A Study of an Insect Cuticle: The Larval Cuticle of *Sarcophaga facultata* Pand. — Proc. roy. Soc. B. 133, 348—373.
- 1947:
The Occurrence and Significance of phenolic hardening in the newly formed Cuticle of Crustacea Decapoda. — Proc. roy. Soc. B. 134, 485—503.
- 1947:
A Study of an Insect Cuticle: The Formation of the Puparium of *Sarcophaga facultata* Pand. — Proc. roy. Soc. B. 134, 79—110.
- Diehl und Iterson, 1935:**
Die Brechung von Chitinsehnern. — Kolloid-Ztschr. 78, 142—146.
- Domenjoz, 1944:**
Experimentelle Erfahrungen mit einem neuen Insektizid (Neocid-Geigy), ein Beitrag zur Theorie der Kontaktgiftwirkung. — Schweiz. med. Wochenschr. 74, 952—974.
- 1946:
Zur biologischen Wirkung einiger DDT-Derivate. — Arch. Int. Pharmacodynamic und Therapie 75, 128—146.
- * Dresden und Krijgsman, 1948:**
Experiments on the physiological Action of Contact Insecticides. — Bull. ent. Res. 38, 575—578.
- Dusham, 1918:**
The Wax Glands of the Cockroach. — J. of Morph. 31, 563—581.
- Eidmann, 1922:**
Die Durchlässigkeit des Chitins bei osmotischen Vorgängen. — Biol. Centr. Bl. 42, 429—435.
- Emmel und Jakob, 1948:**
Über den Feinbau einiger Schuppen von Culiciden. — Zool. Jahrbücher Anat. u. Ontog. 69, 435—442.

- Fraenkel und Rudall, 1940:
A Study of the physical and chemical Properties of the Insect Cuticle. — Proc. roy. Soc. 129, 1—35.
- 1947:
The Structure of Insect Cuticles. — Proc. roy. Soc. 154, 111—144.
- Frey-Wyßling und Mühlethaler, 1950:
Der submikroskopische Feinbau von Chitinzellwänden. — Viertelj. Schr. Naturforsch. Ges. Zürich 95, 45—52.
- Frohberger, 1949:
Untersuchungen über das Verhalten des Insektizids Diäthyl-p-nitro-phenyl-thiophosphats (E 605) auf und in der Pflanze. — Höfchenbriefe 2, 10—91.
- Glick, 1949:
Techniques of Histo- and Cytochemistry. — Interscience Publishers Inc. New York.
- Gonell, 1926:
Röntgenographische Studien an Chitin. — Ztschr. physiol. Chemie 152, 18—30.
- Haeckel, 1857:
Die Gewebe des Flußkrebses. — Arch. Anat. Physiol. 469—568.
- *Hayes und Liu Yu-Su, 1947:
Tarsal Chemoreceptors of the House-fly and their possible Relation to DDT Toxicity. — Ann. ent. Soc. Amer. 40, 401—416.
- Hecht und Wirth, 1950:
Zur Pharmakologie der Phosphorsäureester. — Arch. ex. Pathologie u. Pharmacol. 211, 264—277.
- Hoffmann und Lendle, 1947:
Zur Wirkungsweise neuer insektizider Stoffe. — Arch. ex. Pathologie u. Pharmacol. 205, 223—242.
- Holmgren, 1902:
Über das Verhalten des Chitins und Epithels zu den unterliegenden Gewebearten bei Insekten. — Anat. Anz. 20, 480—488.
- Hurst, 1940:
Permeability of Insect Cuticle. — Nature 145, 462—463.
- 1941:
Insect Cuticle as an asymmetrical Membran. — Nature 147, 388—389.
- 1943:
Permeability and Molecular Constitution as Factors in Drug Action. — Nature 152, 292—296.
- 1947:
Mode of Action of Chlorinated Hydrocarbons with special Reference to DDT Insecticides. — Agricult. Chemicals No. 9, 29.
- 1950:
An Electron Diffraction Study of the crystalline Structure of the Lipoids in the pupal Exuviae of *Calliphora erythrocephala*. — J. exp. Biol. 27, 238—252.
- *Iljinskaya, 1946 (russisch):
The Mechanism of insecticidal Action and the Permeability of the cuticle of Insects. — Rev. appl. Ent. A. 35, 277—278.
- Janisch, 1933:
Untersuchungen über die Ökologie und Epidemiologie der Nonne. — Arb. Biol. Reichsanstalt Land- u. Forstwirtschaft. 20, 269—290.
- Kalmus, 1944:
Action of inert Dusts on Insects. — Nature 155, 714—715.
- Kapzov, 1911:
Über den feineren Bau der Insektenkutikula. — Ztschr. wiss. Zool. 98, 297—337.
- Karrer, 1943:
Lehrbuch der organischen Chemie. — 9. Aufl. G. Thieme, Leipzig.
- Kleiss, 1950:
Fermentative Verdauungsversuche an histologischen Präparaten. — Mikrokosmos 39, 47—50.

- Klimke und Haury, 1950:
Die Atemgiftwirkung neuer insektizider Mittel. — Anz. Schädlingkunde 23, 22—23.
- Klinger, 1936:
Die insektizide Wirkung von Pyrethrum und Derrisgiften und ihre Abhängigkeit vom Insektenkörper. — Arb. physiol. u. angew. Ent. 3, 49—115.
- Koch, 1932:
Der Nachweis des Chitins in tierischen Skelettsubstanzen. — Ztschr. Morph. u. Ökol. 25, 730—756.
- *Kölliker, 1858:
Untersuchungen zur vergleichenden Gewerbelehre. — Würzburger Verh. 1. Reihe 8.
- Krawkow, 1893:
Über verschiedenartige Chitine. — Ztschr. für Biol. 11.
- Krüger, 1931:
Untersuchungen über die Giftwirkung von dalmatinischem Insektenpulver auf die Larven von *Corethra plumicornis*. — Ztschr. angew. Entom. 18, 344—353.
- Kühn, 1946:
Konstruktionsprinzipien von Schmetterlingsschuppen nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen. — Ztschr. für Naturforschung 1, 348—350.
- Kühn und Piepho, 1938:
Die Reaktionen der Hypodermis und der Versonschen Drüsen auf das Verpupphormon bei *Ephestia kuehniella*. — Biol. Zentralblatt 58, 12.
- Kühnelt, 1928:
Über den Bau des Insektskeletts. — Zool. Jahrb. 50, 219—278.
- 1928:
Studien über den mikrochemischen Nachweis des Chitins. — Biol. Zentralblatt 48, 374—382.
- Kunicke, 1925:
Nachweis und Verbreitung org. Skelettsubstanzen bei Tieren. — Ztschr. vergl. Physiol. 2, 233—253.
- Läuger, Martin und Müller, 1944:
Über Konstitution und toxische Wirkung von natürlichen und neuen synthetischen insektenabtötenden Stoffen. — Helvetica chem. Acta 27, 892—928.
- *Ledderhose, 1876:
Ber. deutsch. chem. Ges. 9, 1200.
- Lees, 1947:
Transpiration and Structure of the Epicuticle in Ticks. — J. Exp. Biol. 23, 379—410.
- 1948:
Passive and active Water Exchange through the Cuticle of Ticks. — Dis. Faraday Soc. No. 3, 187—192.
- Leydig, 1864:
Über den Bau des tierischen Körpers. — Verl. Tübingen.
- Lietz, 1948:
Zur Kenntnis und Anwendung von DDT in der modernen Insektenbekämpfung. — Pharmazie 3, 390—397.
- Lord, 1948:
The Sorption of DDT and its Analogues by Chitin. — Biochem. Journ. 43, 72—78.
- Meyer, 1938:
Die submikroskopische Struktur der kutinisierten Zellmembranen. — Protoplasma 29, 552—586.
- Meyer, A., 1907:
Erstes mikroskopisches Praktikum. — Fischer, Jena.
- Meyer, H., 1842:
Über den Bau der Hornschale der Käfer. — Müllers Archiv.
- Meyer, R., 1948:
Mikrobiologisches Praktikum. — Wolfenbütteler Verlagsanstalt.

- Meyer, K. H., und Mark, 1928:
Über den Aufbau des Chitins. — Ber. dtsch. chem. Ges. 61², 1936.
- Meyer, K. H., und Pankow, 1935:
Sur la constitution de la chitine. — Helvetica chem. Acta 18, 589—598.
- Möhring, 1926:
Zur Doppelbrechung natürlicher Zellulosefasern und des Chitins. — Koll. chem. Beihefte 23, 162—188.
- * Odier, 1823:
Memoire sur la composition chimique des parties cornées des Insectes. — Mem. soc. Hist. nat. 1, 29.
- * O' Kane und Glover, 1935:
Penetration of Arsenic into Insects. — Rev. appl. Ent. A, 24, 81.
- * O' Kane, Glover, Blickle und Parker, 1940:
Penetration of certain Liquids through the Pronotum of the American Roach. — Rev. appl. Ent. A, 30, 47.
- Pal, 1950:
The Wetting of Insect Cuticle "Fundamental Studies on Insecticides". — Achter internat. Kongreß f. Entomologie, Stockholm, 936—937.
- Pfaff, 1950:
Ein neues Verfahren zur Herstellung von Chlordioxydlösungen zum Bleichen und Erweichen der Insektenkutikula. — Mikrokosmos, 39, 261—262.
- 1949:
Die Dicke der Kutikula bei Blattläusen. — Ztschr. Pflanzenkr. u. Pflanzenschutz 56, 293—294.
- Pfeiffer, 1949:
Das Polarisationsmikroskop als Meßinstrument in Biologie und Medizin. — Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig.
- Plotnikow, 1904:
Über die Häutung und einige Elemente der Haut der Insekten. — Ztschr. wiss. Zool. 76, 333.
- Potts und Vanderplank, 1945:
Mode of Entry of Contact Insecticides. — Nature 156, 112.
- Pryor, 1940:
On the Hardening of the Cuticle of Insects. — Proc. roy. Soc. B. 128, 393.
- * — 1947:
Über das Erhärten der Elpakete von Küchenschaben (*Blatta orientalis*). — Rev. appl. Ent. A, 35, 202.
- Reed und Rudall, 1948:
Electron Microscop Studies on the Structure of Earthworm Cuticle. — Biochem. Biophys. Acta 2, 7—18.
- Richards, 1947:
Studies of Arthropod Cuticle I. — Ann. Ent. Soc. American 40, 227—240.
- 1948:
Knowledge of Insect Habits and Physiology Essential for most effective chemical Control. — Agr. Chem. 33, 34—77.
- 1949:
Studies on Arthropod Cuticle III. — Science 109, 591—592.
- Richards und Anderson, 1942:
Electron Microscope Studies of Insect Cuticle. — J. Morph. 71, 135—183.
- Richards und Hsing Yan Fau, 1949:
Studies on Arthropod Cuticle V. — J. cellular com. Physiol. 33, 177—198.
- Richards und Gutkop, 1946:
Correlation between the Possession of a Chitinous Cuticle and Sensitivity to DDT. — Biol. Bull. 90, 97—108.
- Richards und Korda, 1948:
Studies on Arthropod Cuticle II. — Biol. Bull. 94, 212—235.
- 1950:
Studies on Arthropod Cuticle IV. — Ann. Entom. Soc. of America 43, 49—71.
- Roan, Fernando und Kearns, 1950:
A Radiobiological Study of four Organic Phosphats. — Journ. Ent. 43, 319—325.

- Roka, 1951:
Über den Wirkungsmechanismus der Kontaktinsektizide. — Ztschr. hyg. Zool. u. Schädlingsbek. 39, 14—23.
- Romeis, 1948:
Mikroskopische Technik. — Leibnitz Verlag.
- *Roy und Ghosh, 1944:
The Mechanism of Action of Contact Insecticide. — Rev. appl. Ent. A. 32, 419.
- Schaerffenberg, 1949:
Über die Eintrittsstellen der Kontaktgifte und die Ursachen der DDT-Resistenz der Maikäferlarve. — Ztschr. Pflanzenkr. u. Pflanzenschutz 56, 37—39.
- Schmid, 1949:
Beobachtungen über die Wirkung des DDT-Geigy auf Vogelmilben und Federlinge. — Vet. bakt. u. parasit. Inst. Bern.
- Schmidt, 1845:
Zur vergleichenden Physiologie der Tiere.
- Schmidt, W. J., 1924:
Anleitung zur polarisationsmikroskopischen Untersuchung für Biologen. — Friedr. Cohen Verl. Bonn.
- 1947:
Der Wandel der optischen Anisotropie bei topochemischen Reaktionen histologischer Strukturen. — Ber. Oberhess. Ges. Natur- u. Heilkunde 23, 56—85.
- Schneider, 1902:
Lehrbuch der Histologie. — Fischer, Jena.
- Schulze, 1913:
Chitin und andere Kutikulastrukturen bei Insekten. — Verh. dtsch. Zool. Ges., 165—195.
- 1921:
Eine neue Methode zur Bleichung und Erweichung tierischer Hartgebilde. — Ges. Naturfreunde, Berlin, 135.
- Schulze und Kunicke, 1923:
Zur Mikrochemie tierischer Skelettsubstanzen. — Biol. Zentralblatt 43, 556—559.
- 1925:
Der Nachweis und die Verbreitung des Chitins. — Ztschr. Morph. Oekol. Tiere 2, 643—666.
- Sprengel, 1934:
Gegenwärtiger Stand der Kenntnisse über Pyrethrum als Insektengift. — Anz. Schädlingskunde 10, 1—7.
- Stellwaag und Staudenmayer, 1940:
Wie wirkt Dinitro-ortho-kresol auf Insekten. — Anz. Schädlingskunde 16, 37—38.
- Sukatschoff, 1899:
Über den feineren Bau einiger Cuticulae und der Spongienfasern. — Ztschr. wiss. Zool. 66, 377—406.
- Tischler, 1935:
Studies on how Derris kills Insects. — J. Econ.-Ent. 28, 215—220.
- Trim, 1941:
The Protein of Insect Cuticle. — Nature 147, 115—116.
- Trucksess, 1950:
Probleme des Hexachlorcyclohexans. — Chem.-techn. Industrie 46, 145—147 (in: Seifen - Öle - Fette - Wachse).
- *Tullberg, 1881:
Studien über den feineren Bau und das Wachstum des Hummerpanzers. — Schwed. Akad. Wiss. 19.
- *Vizou, 1881:
Recherches sur la structure et la formation des téguments chez les Crustacées Décapodes. — Arch. Zool. exp. et génér. 10, 451—579.
- Webb, 1949:
The Permeability of Insect Cuticle. — Soc. Exp. Biol. 3, 143—163.
- 1950:
A physical Mechanism governing the Rate of Penetration of Contact Insecticides. — Achter intern. Kongreß f. Entomol. Stockholm, 974—978.

- Webb und Green, 1945:
On the Penetration of Insecticides through the Insect Cuticle. — J. exp. Biol. 22, 8—20.
- Weber, 1933:
Lehrbuch der Entomologie. — Fischer, Jena.
- Wiesmann, 1938:
Struktur der Kutikula des Puppentönnchens der Kirschfliege. — Viert.-Jahreschr. Naturf. Ges. Zürich 83, 127—136.
- 1946:
Untersuchungen über die Eintrittspforten des DDT in den Insektenkörper. — Verh. Schweiz. Naturf. Ges. 166—167.
- 1947:
Untersuchungen über das physiologische Verhalten von *Musca domestica* L. verschiedener Provenienzen. — Mitt. Schweiz. ent. Ges. 20, 484—504.
- 1949:
Die Eintrittspforten des p',p'-Dichlordiphenyltrichloräthans am Insektenkörper. — Mitt. Schweiz. ent. Ges. 22, 257—291.
- Wigglesworth, 1941:
Permeability of Insect Cuticle. — Nature 147, 116.
- * -- 1942:
Some Notes on the Integument of Insects in Relation to the Entry of Contact Insecticides. — Bull. ent. Res. 33, 205—218.
- 1944:
Action of inert Dusts on Insects. — Nature 153, 493—494.
- * -- 1945:
Transpiration through the Cuticle of Insects. — J. exp. Biol. 21, 97—114.
- 1946:
Water Relations of Insects. — Experientia 2, 210—214.
- 1947:
The Epicuticle in an Insect, *Rhodnius prolixus*. — Proc. roy. Soc. B. 134, 163—181.
- 1948:
The Insect Cuticle as a Living System. — Dis. Faraday Soc. No. 3, 172—177.
- 1950:
The Principles of Insect Physiology. — London: Methuen & Co. Ltd. 4. Aufl.
- 1950:
The Insect Epicuticle. — Achter intern. Kongr. f. Entomologie, Stockholm, 307—309.
- Witt, 1947:
Ein Test zur Prüfung der Wirksamkeit insektizider Substanzen und ein Beitrag zum Mechanismus der Wirkung von DDT und HCC. — Ztschr. Naturforschung 2b, 361—366.
- Yonge, 1932:
On the Nature and Permeability of Chitin. — Proc. roy. Soc. B. 111, 298—329.
- Zacher, 1950:
Vortrag: Oberflächenaktive Pulver. — Ent. Koll. Berlin-Zehlendorf.
- Zander, 1897:
Vergleichende und kritische Untersuchungen zum Verständnis der Jodreaktion des Chitins. — Pflüger's Arch. Physiol. 66.
- Zänker, 1940:
Untersuchungen über die Durchlässigkeit der Honigblase und des Chitinpanzers von *Apis mellifica* L. für Arsen. — Ztschr. angew. Ent. 27, 114—125.

Tafelanhang
zu den

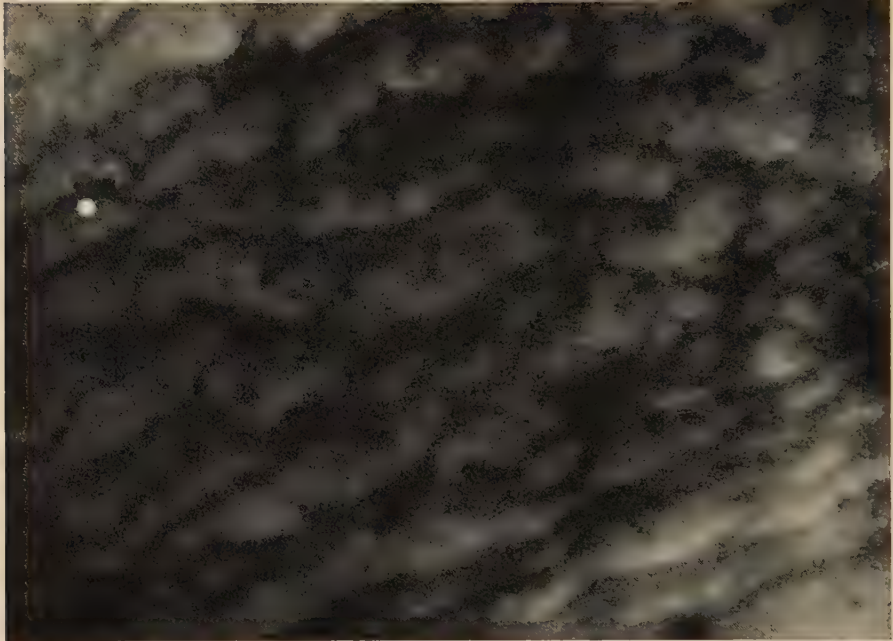
Untersuchungen über den
Aufbau der Insektenkutikula



Tafel 1. Querschnitt durch das Pronotum von *Periplaneta americana*: a) äußere Exokutikula; b) innere Exokutikula; c) Endokutikula. (Die Epikutikula ist nicht sichtbar.) Färbung: Heidenhain Azan (Vergr.: 2000mal).



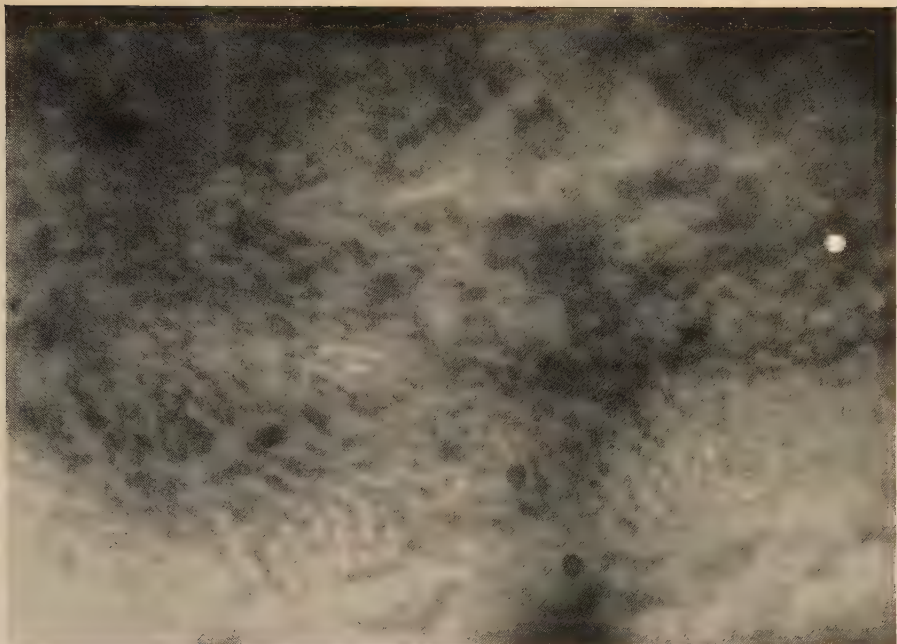
Nach Pepsinbehandlung wird die Lamellenstruktur der inneren Exokutikula sichtbar.



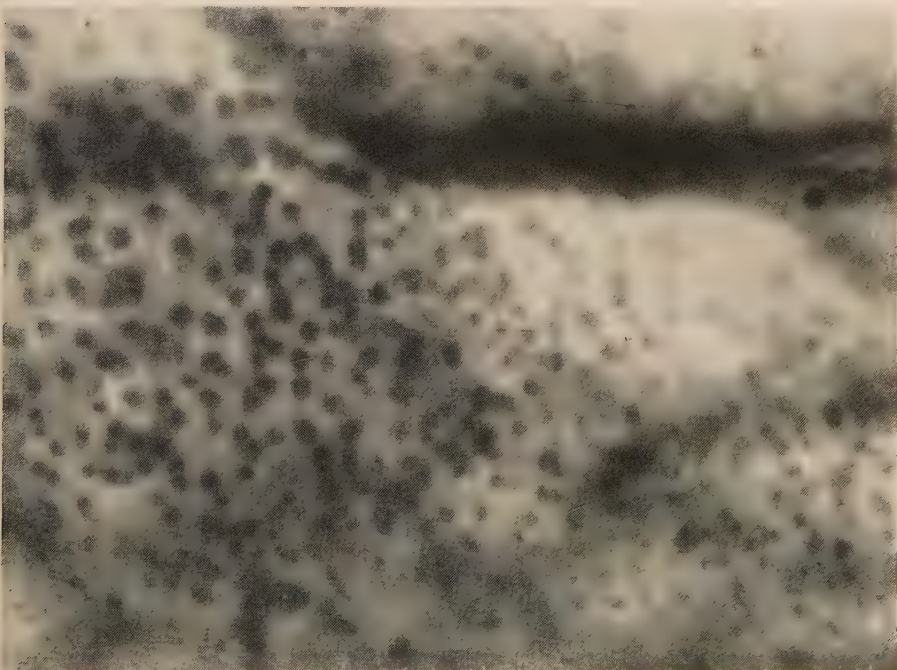
Tafel 2. *Periplaneta americana*: Lamellenstruktur der inneren Exokutikula des Pronotums; durch schräge Schnittführung vergrößert (Vergr.: 2400 mal).



Tafel 3. *Periplaneta americana*: Flächenansicht der äußeren Exokutikula des Pronotums mit felderartig angeordneten Porenkanälen (Vergr.: 2400 mal).



Tafel 4. *Periplaneta americana*: Porenkanäle an der Grenze der äußeren zur inneren Exokutikula (Vergr.: 2400 mal).



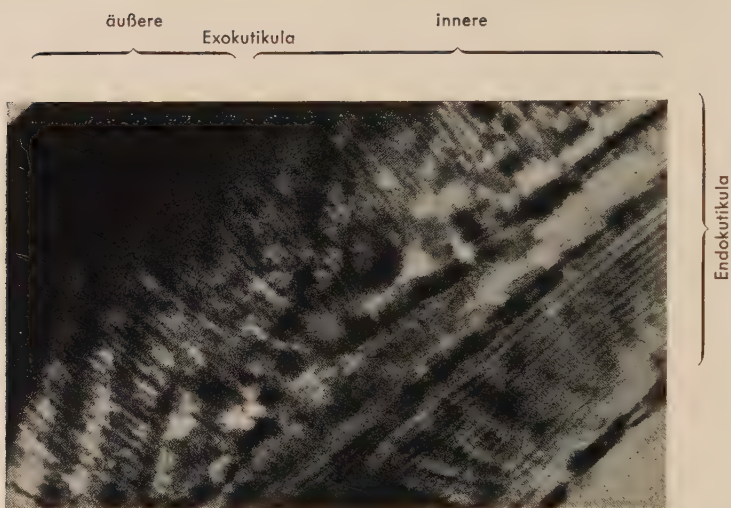
Tafel 5. *Periplaneta americana*: Die trichterförmig erweiterten Porenkanäle in der äußersten Zone der Endokutikula (Vergr.: 2400 mal).



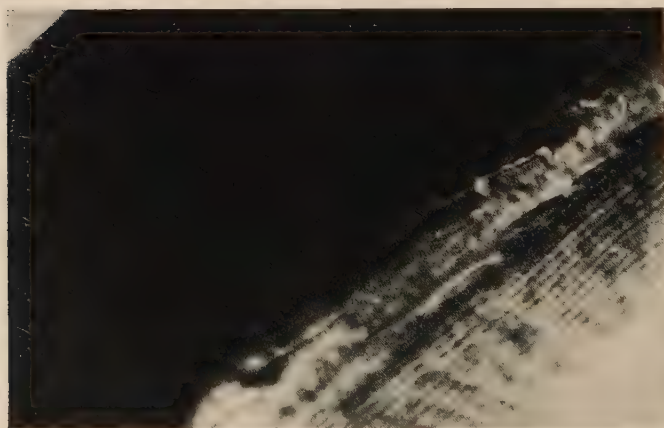
Tafel 6. *Periplaneta americana*: Der Flächenschnitt zeigt die Porenkanäle nahe der Grenze der inneren Exo-
kutikula zur Endokutikula. Färbung: Heidenhain Azan (Vergr.: 2000 mal).



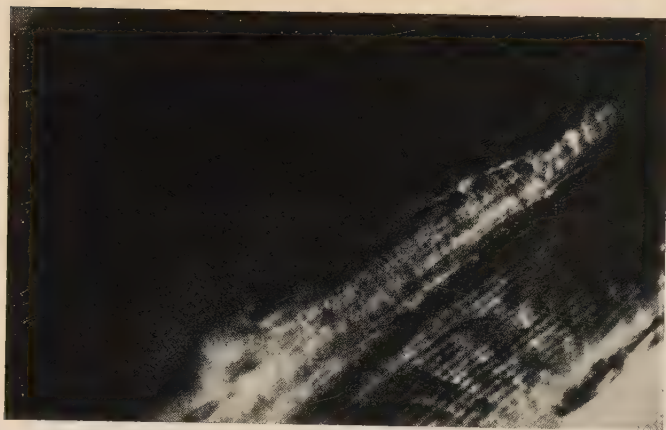
Tafel 7. *Periplaneta americana*: Flächenbild der Intersegmentalhaut. Porenkanäle nach Plasmafärbung (Meyer)
(Vergr.: 2000 mal).



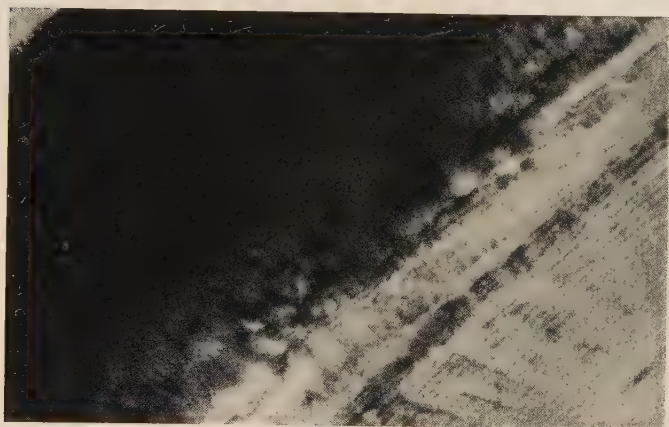
Tafel 8. Querschnitt durch das Pronotum von *Periplaneta americana*. Die Gegenüberstellung zeigt die unterschiedliche Absorption bei verschiedenen Wellenlängen (Vergr.: 2400 mal, im Druck um etwa $\frac{2}{10}$ verkleinert). Wellenlänge: Zn 330 m μ .



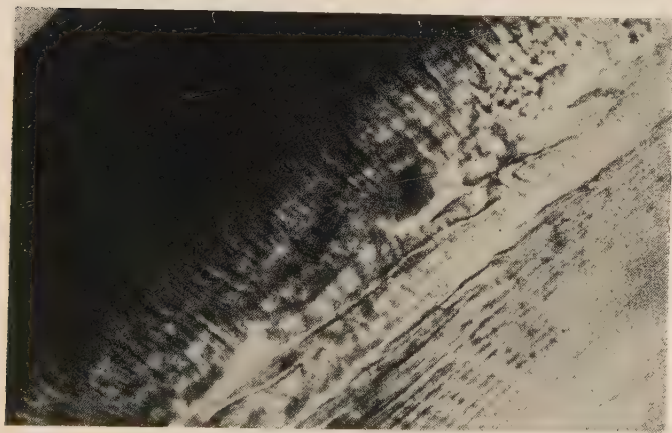
Wellenlänge: Mg 280 m μ .



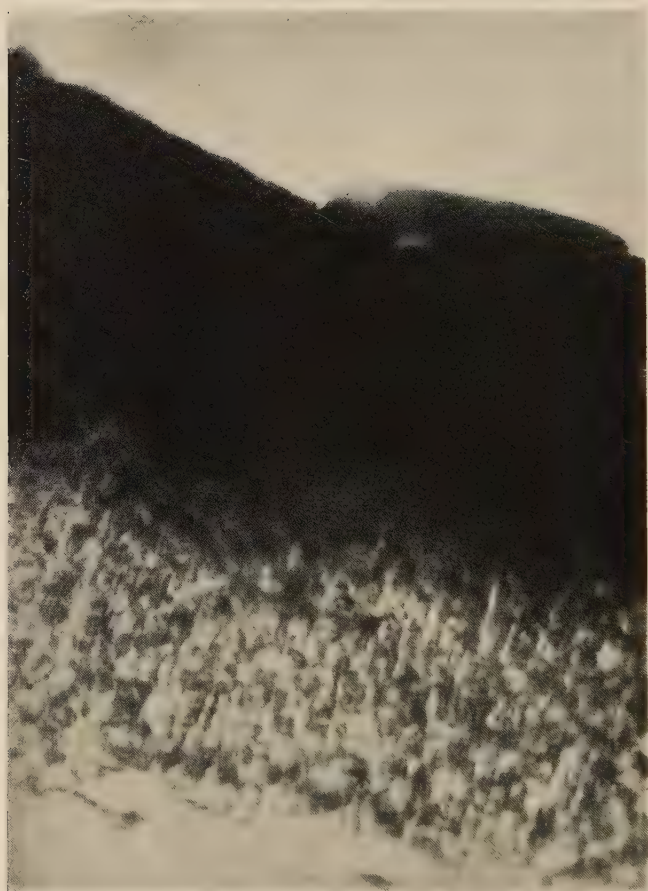
Wellenlänge : Cd 275 m μ .



Wellenlänge : Cd 257 m μ .



Wellenlänge : Zn 250 m μ .



ä.
Exokutikula

i.
Exokutikula

Tafel 9. *Periplaneta americana*: Querschnitt durch das Pronotum. Wellenlänge: λ 250 μ (Vergr. 2400 mal).

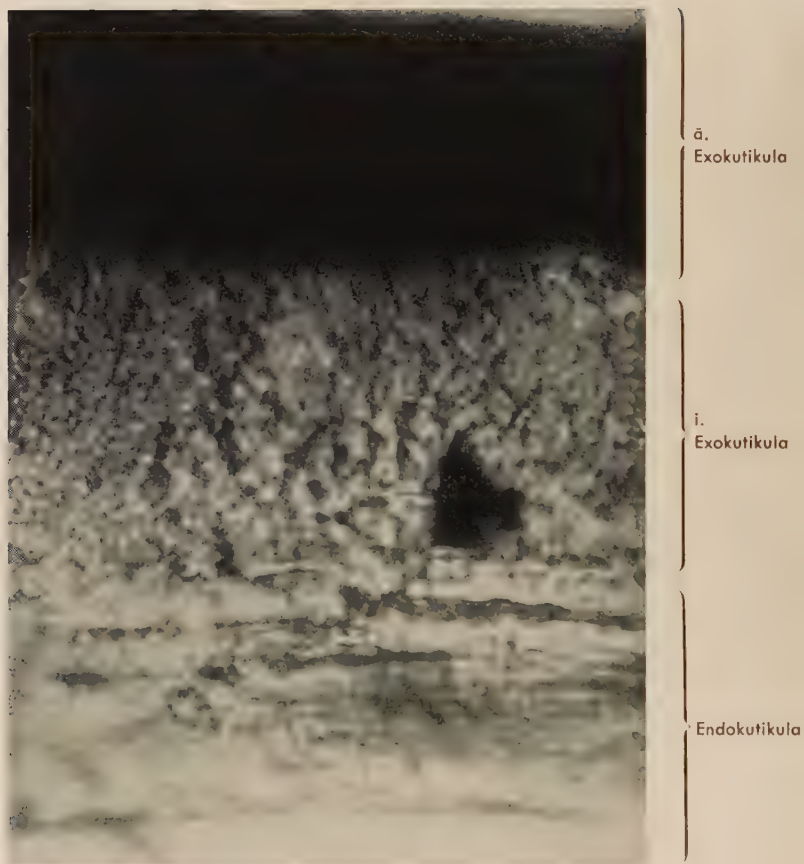


ä.
Exokutikula

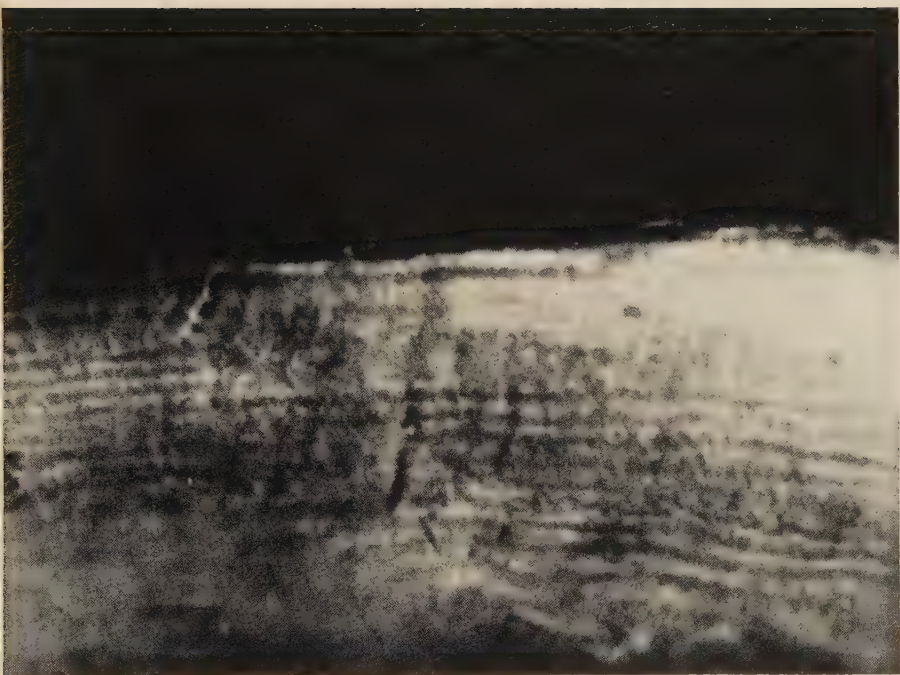
i.
Exokutikula
Lamellen-
Grund-
struktur

Endokutikula

Nach Behandlung mit Pepsin.



Tafel 10. Querschnitt durch das Pronotum von *Periplaneta americana* nach Extraktion mit Chloroform. Wellenlänge: Zn 250 m μ (Vergr.: 2400 mal).



ä.

Exokutik

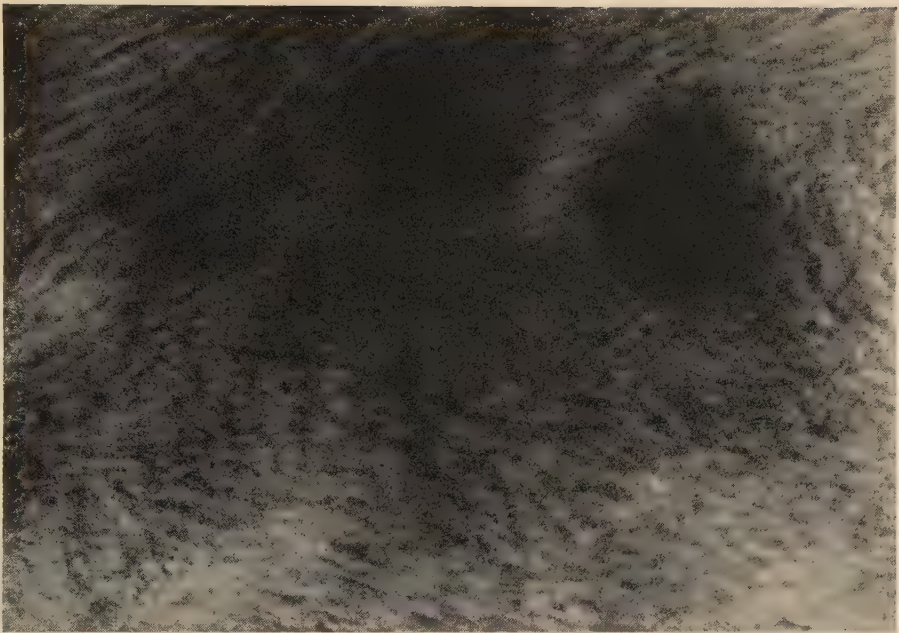
i.

Exokutik

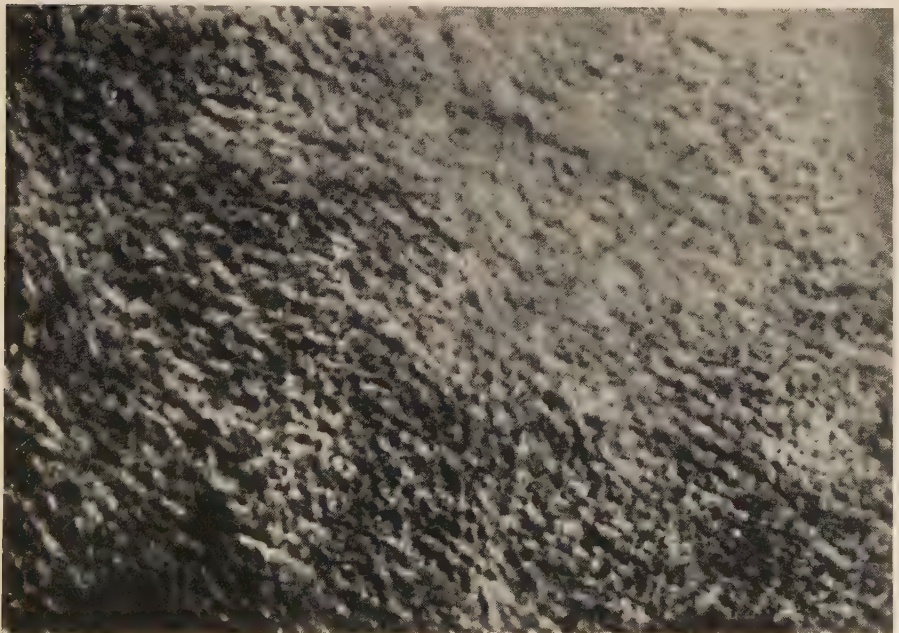
Nach zusätzlicher Verdauung mit Pepsin tritt die Lamellenstruktur deutlich hervor.



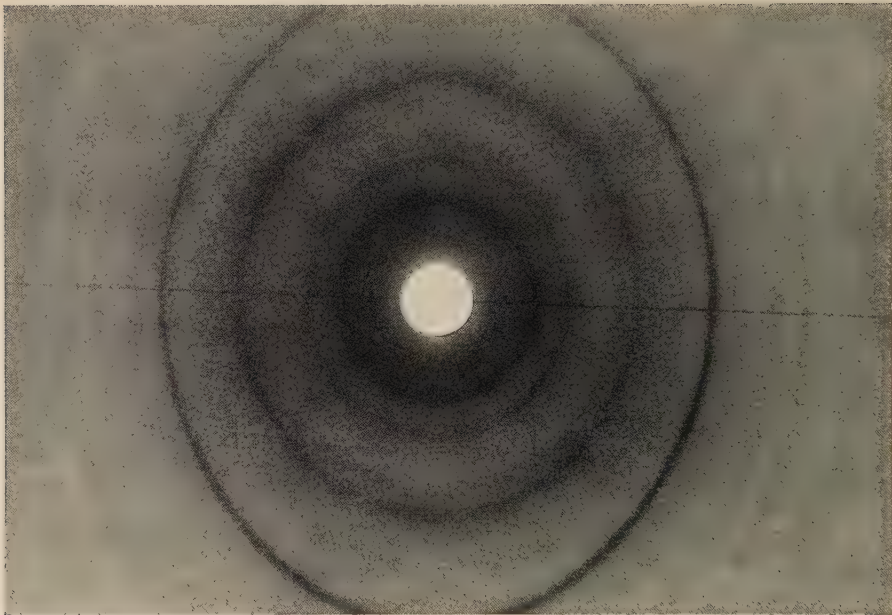
Tafel 11. Die Flächenansicht der Endokutikula des Pronotums von *Periplaneta americana* zeigt nach Verdauung mit Pepsin die Fibrillenstruktur der Lamellen. Wellenlänge: λ 275 m μ (Vergr.: 2400mal).



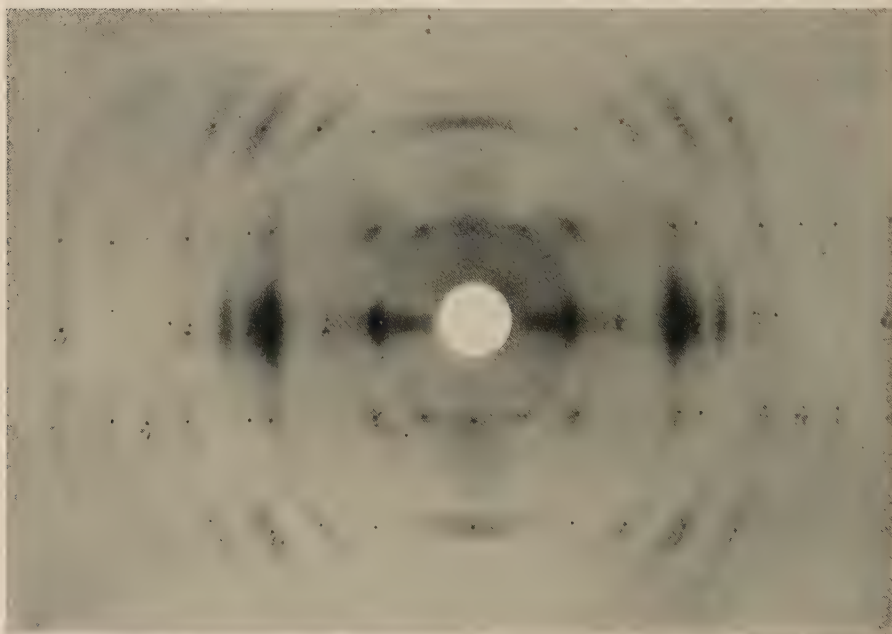
Tafel 12. Die Fibrillen überkreuzen sich in den aufeinanderfolgenden Lamellen (nach unvollständiger Pepsinverdauung). Wellenlänge: Zn 250 m μ (Vergr.: 2400 mal).



Tafel 13. Nach Chloroform- und Pepsinbehandlung bestehen die Lamellen nur aus reinen Chitinfibrillen. Wellenlänge: Zn 250 m μ (Vergr.: 2400 mal).



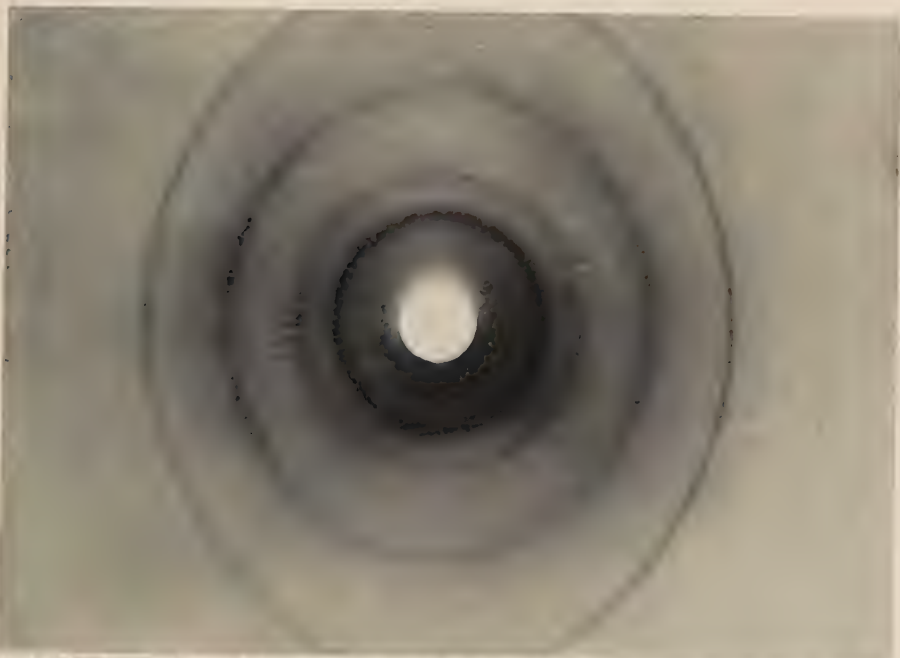
Tafel 14. Das Röntgendiagramm der Endokutikula von *Periplaneta americana* zeigt nach Behandlung mit Chloroform und Pepsin die für Chitin charakteristischen Linien. Wellenlänge: 2.285 Å
(Chromstrahlung).



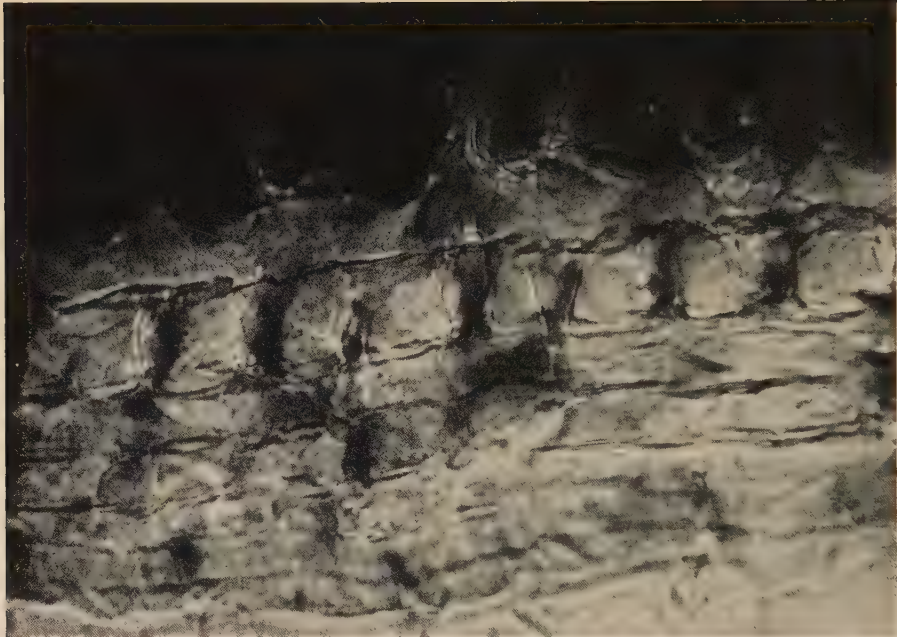
Tafel 15. Röntgendiagramm von Hummer-Sehnen zum Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Chitindiagrammen. (Die Punkte stammen von der Auswertung.)



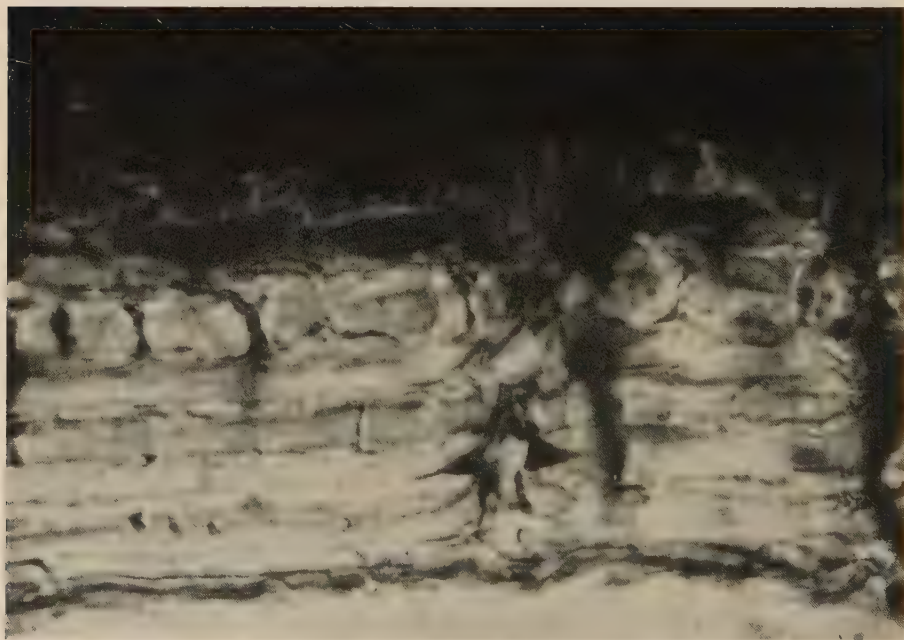
Tafel 16. Bei unbehandelten Häuten frisch gehäuteter Küchenschaben kommen nur die stärksten Linien des Chitindiagrammes durch.



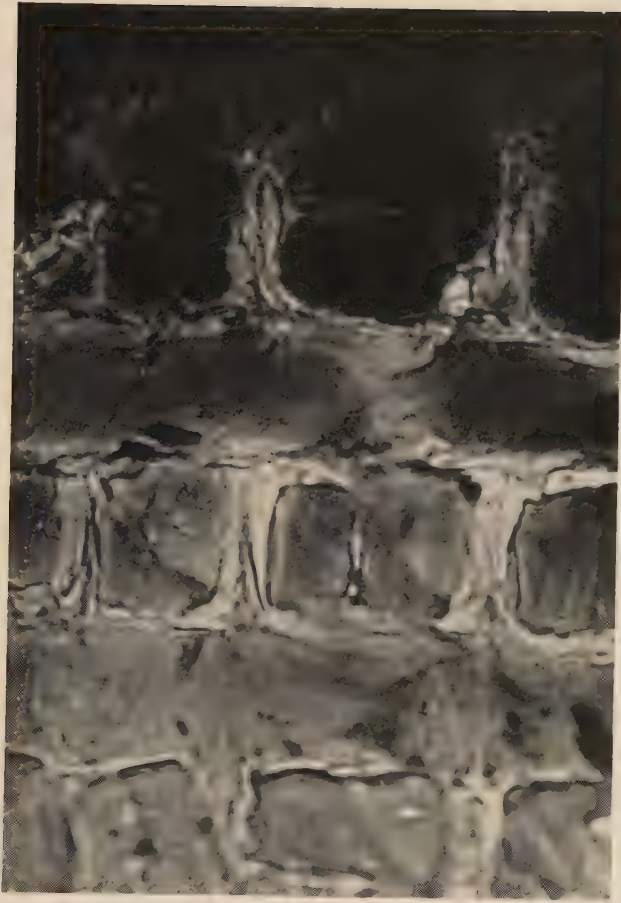
Nach Cholin- und Pepsinbehandlung zeigt auch die Kutikula frisch gehäuteter Küchenschalen die charakteristischen Linien des Chitindiagrammes.



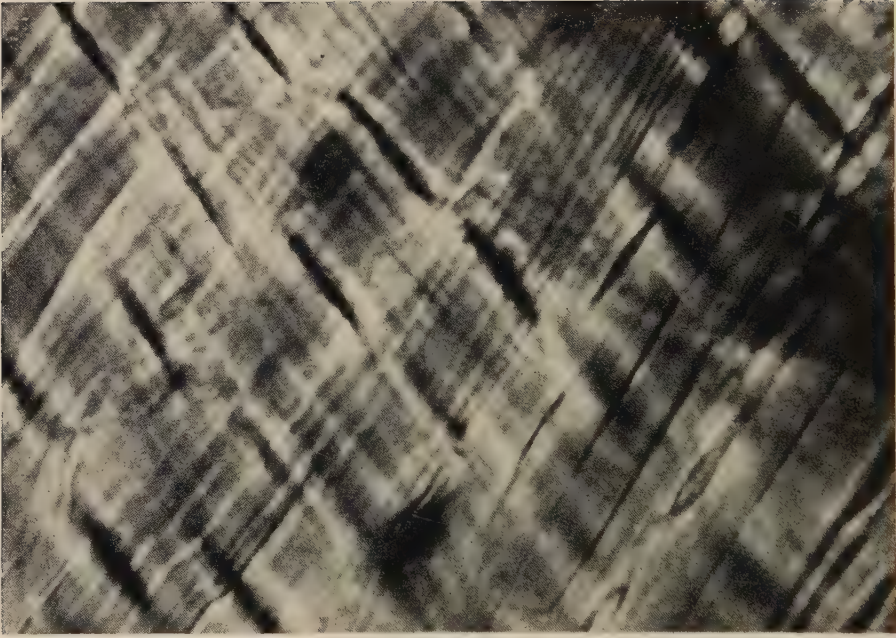
Tafel 17. *Melolontha vulgaris*: Querschnitt durch das Pronotum. Zwischen den Balken sind die dunklen Proteinhüllen sichtbar. Wellenlänge: Cd 275 m μ l (Vergr.: 1650 mal).



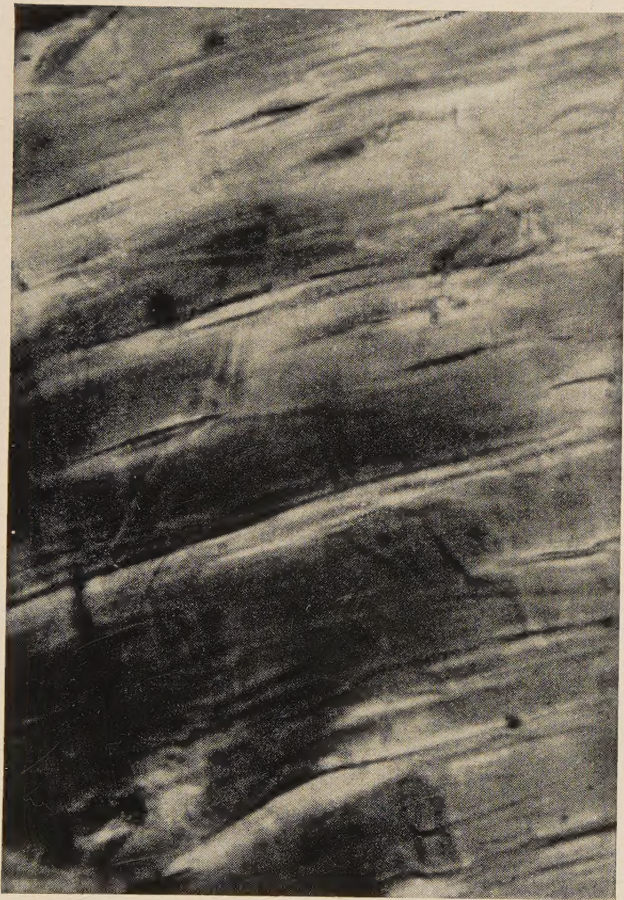
Nach Verdauung mit Pepsin fehlen die Proteinhüllen.



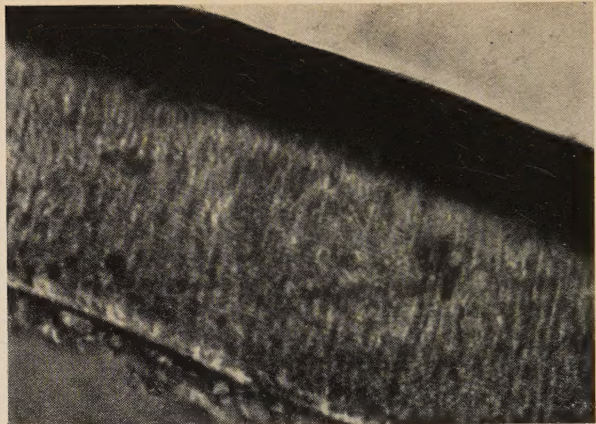
Tafel 18. Stark vergrößerte Wiedergabe des verdauten Querschnittes durch das Pronotum von *Melolontha vulgaris*. Zwischen den Balken sind noch geringe Proteinreste erkenntlich. Wellenlänge: Cd 275 m μ (Vergr.: 2400 mal).



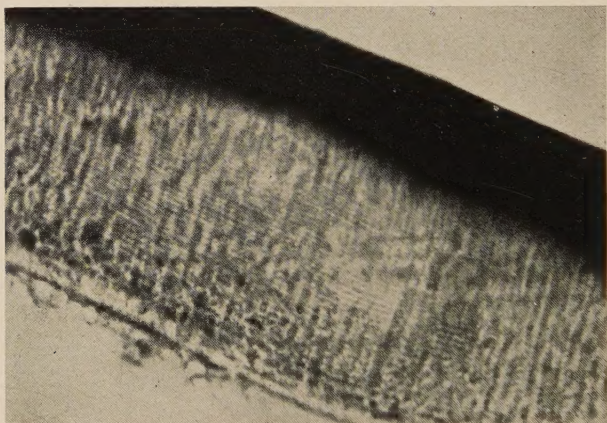
Tafel 19. *Melolontha vulgaris*: Die Flächenansicht der Endokutikula des Pronotums läßt nach Chloroformextraktion und unvollständiger Pepsinverdauung die Fibrillen und Balken gut erkennen. Die Balken überkreuzen sich in einem Winkel von etwa 75° . Wellenlänge: Cd $275\text{ m}\mu$ (Vergr.: 2400 mal).



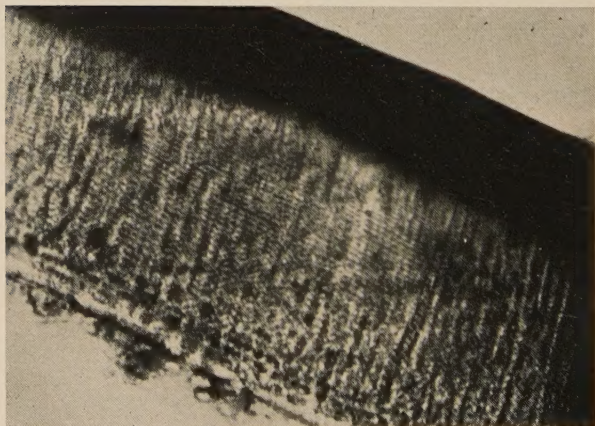
Tafel 20. *Rhodnius prolixus*: Flächenansicht einer einzelnen Balkenlage.
Nach vollständiger Pepsinverdauung treten die reinen Chitin-
fibrillen weniger gut hervor. Wellenlänge: Cd 275 m μ
(Vergr.: 2400 mal).



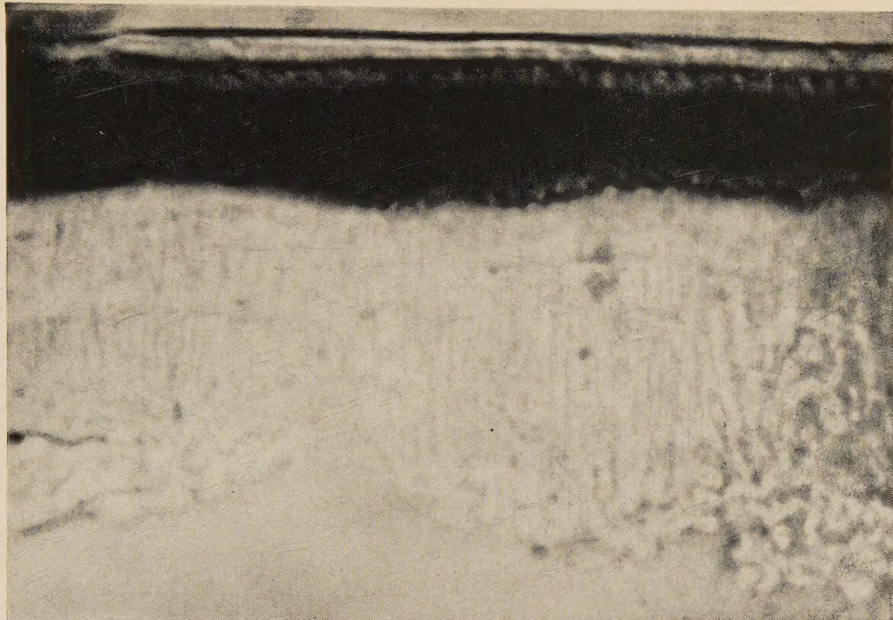
Tafel 21. *Periplaneta americana*: Querschnitt durch das frisch gehäutete Pronotum. Keine wesentlichen Unterschiede in der Absorption bei verschiedenen Wellenlängen. Wellenlänge: Zn 330 m μ (Vergr.: 2400 mal, im Druck um $\frac{2}{10}$ verkleinert).



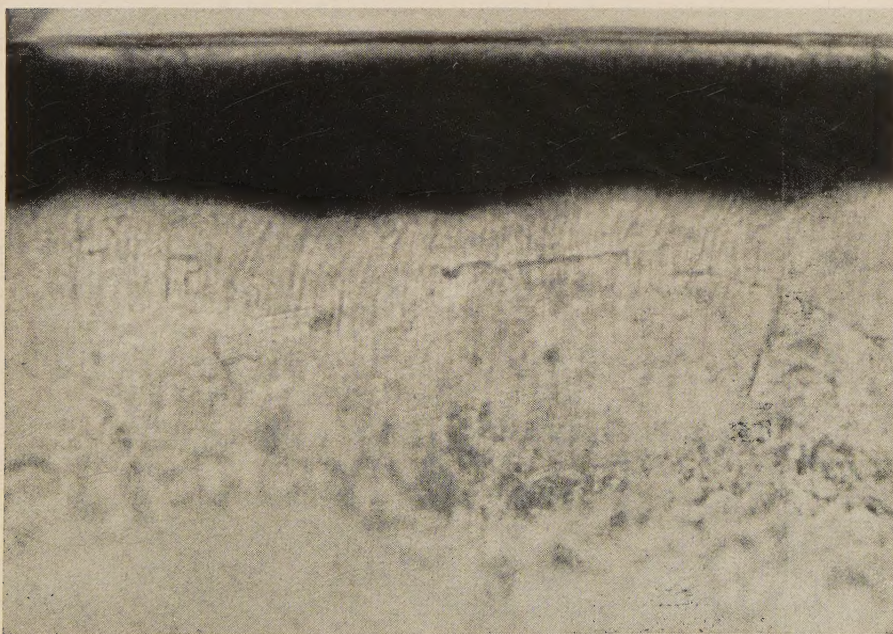
Wellenlänge: Mg 280 m μ .



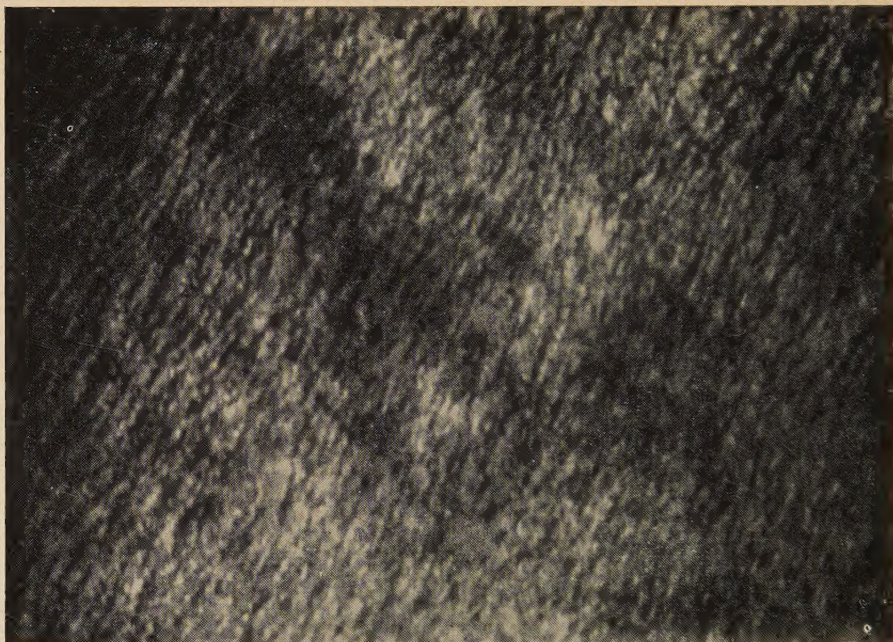
Wellenlänge: Zn 250 m μ .



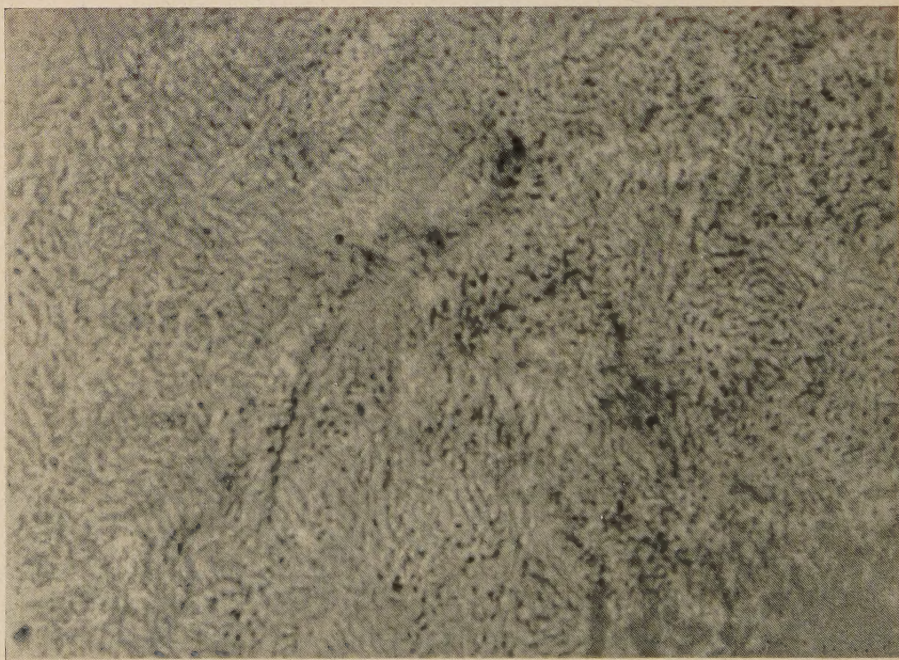
Tafel 22. Nach Pepsinverdauung verschwindet die Lamellenstruktur, während die Porenkanäle erhalten bleiben.
Wellenlänge: Zn 330 m μ (Vergr.: 2400 mal).



Wellenlänge: Zn 250 m μ .



Tafel 23. *Periplaneta americana*: Die Flächenansicht des unbehandelten Pronotums zeigt bereits etwa zwei Stunden vor der Häutung die Fibrillenstruktur der Lamellen. Wellenlänge: Zn 250 m μ (Vergr.: 2400 mal).



Tafel 24. Die auf Tafel 23 sichtbare Fibrillenstruktur verschwindet nach Behandlung mit Chloroform und Pepsin weitgehendst. Wellenlänge: Zn 250 m μ (Vergr.: 2400 mal).